台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.69 No.4 2020

Research Articles

265 Rediscovery of *Philopona vibex* (Erichson, 1834) (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini) in Taiwan, with Notes on Its Biology

Chi-Feng Lee and Mei-Hua Tsou

274 Occurrence of *Ralstonia solanacearum* Race 1/Biovar 1/Phylotype II/Sequevar 7 Causing Tomato Bacterial Wilt in Taiwan

Chia-Hsin Tsai, Shu-Ling Hwang, Jia-Rong Li, Ching-Yi Lin, and Yun-Sheng Lu

286 Study on Cryopreservation of Orchidaceae Seeds by Silica Gel Desiccation and Its Application

Rung-Yi Wu, Ching-Ping Lin, Ting-Fang Hsieh, Keng-Chang Chuang, Ting-En Dai, and Yu-Sen Chang

298 The Study of Salt Tolerance in Sweet Potato Mutants

Po-Hsien Lu, Ting-Zhu Zhan, and Yung-Chang Lai

312 Effect of Glutathione on *In Vitro* Proliferation and *Ex Vitro* Growth of *Hippeastrum* hybridum Plantlets

Uei-Chern Chen, Jhin-Yi Tsao, Tzu-Ying Wu, and Chi-Ni Hsia

Short Communication

326 Establishment of a Rue Plant Breeding System for Harmine by Using Collected Seeds and Micropropagation

Ke-Wei Liu, Li-Ting Sun, and Li-Te Chin

ISSN 0022-4847

9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.69 No.4 2020

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.69 No.4 2020

研究報告

265 台灣產縱紋胖爪葉蚤的再次發現與生物學注解 (鞘翅目：金花蟲科：螢金花蟲亞科：葉蚤族)

李奇峰、曹美華

274 青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* Race 1/Biovar 1/Phylotype II/Sequevar 7) 引起之番茄青枯病

蔡佳欣、黃淑苓、李佳蓉、林靜宜、呂昀陞

286 矽膠乾燥技術於蘭科植物種子超低溫保存上之應用研究

吳容儀、林景平、謝廷芳、莊耿彰、戴廷恩、張育森

298 甘藷誘變品系耐鹽性之研究

陸柏憲、詹庭筑、賴永昌

312 穀胱甘肽對孤挺花組培苗瓶內增殖與瓶外生長之影響

陳威臣、曹進義、吳姿穎、夏奇鈮

研究簡報

326 芸香種子中肉桂芸香鹼成分分析與微體繁殖系統之建立

劉克威、孫立庭、金立德

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編 (按筆劃序)

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
柯俊成／國立台灣大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業藥物毒物試驗所
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

邀請領域主編

張耀乾／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳彥銘／國立中興大學園藝學系

編輯助理

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯顧問

吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳烈夫／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第六十九卷　第四期　　中華民國一〇九年十二月三十一日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　林學詩
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://www.ipress.tw/J0042

編印　Ainosco Press
地址　23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店 / 10485 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02)2518-0207
　國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
　2. 五南文化廣場 / 40042 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04)2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(4):265–273 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202012_69(4).0001

Research Article

Rediscovery of *Philopona vibex* (Erichson, 1834) (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini) in Taiwan, with Notes on Its Biology

Chi-Feng Lee[1,*] and Mei-Hua Tsou[2]

Abstract

Lee, C. F. and M. H. Tsou. 2020. Rediscovery of *Philopona vibex* (Erichson, 1834) (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini) in Taiwan, with notes on its biology. J. Taiwan Agric. Res. 69(4):265–273.

Flea beetle, *Philopona vibex* (Erichson, 1834), is widespread in Asia but largely unknown from Taiwan. The first and only record in Taiwan was cited by Chûjô (1936) based on one specimen collected by J. Sonan in 1918. There has been no record of taxonomic publication since then. Here we re-described the species based on specimens collected from China, Japan and Taiwan, including two specimens from Ilan by Hou-Jay Chen on May 17, 2009, and six specimens from Taipei by Su-Fang Yu and Mei-Hua Tsou in March of 2016. The life cycle of this species is briefly described based on the successful rearing of 50 adults from eggs. Diagnostic characters are illustrated, including antenna, penis, gonocoxae, abdominal ventrite VIII in both sexes, and abdominal ventrite V in female. Its rarity in Taiwan is discussed in the context of its biology.

Key words: Leaf beetles, Taxonomy, *Hygrophila*, Endophallic sclerites.

INTRODUCTION

Philopona Weise, 1903 is a genus of flea beetles containing more than 40 species occurring in the southeastern Palearctic, Oriental region, Australia and Africa, including Madagascar (Konstantinov & Vandenberg 1996). The genus is recognized easily by the strongly dilated metatarsal claw segment, pronotum possessing a wide lateral margin and ante-basal transverse impression. *Philopona vibex* (Erichson 1834) is one of the most widespread species within the genus and a number of synonyms exist due to intraspecific variations across its broad distribution. The species was described originally from China (Erichson 1834). Its immature stages and biology were studied in Japan (Kimoto & Takizawa 1994) and mainland China (Hua *et al*. 2014). However, it seems extremely rare in Taiwan. Chûjô (1936) was the first to record the species from Taiwan. It was collected more than hundred years ago with no further record in the intervening period. The Taiwan Chrysomelid Research Team (TCRT) started their inventory of all species of Chrysomelidae during 2005. Mr. Hou-Jay Chen, a member of TCRT, found one adult and one larva on leaves of *Plantago asiatica* L. (Plantaginacea) during spring of 2009 from Ilan County, northeastern Taiwan. Another member of TCRT, Su-Fang Yu, found one adult on leaves of *Hygrophila salicifolia* (Vahl) Nees (Acanthaceae) on March 2, 2016

Received: May 18, 2020; Accepted: July 9, 2020.
* Corresponding author, e-mail: chifeng@tari.gov.tw
1 Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
2 Citizen Scientist, Taipei City, Taiwan, ROC.

at Kuantu (關渡), Taipei, north Taiwan. The next day, two more adults were found on leaves of *Hygrophila pogonocalyx* Hayata at Chihshanyan (芝山岩), Taipei. Two days later, more adults were collected from the same plants in the same locality by herself and Mei-Hua Tsou. They usually stayed concealed under young shoots (Fig. 16) or mating (Fig. 17) on the leaves of the host plant. Those adults were transferred to the room for rearing, and approximately 50 adults were emerged successfully rearing from eggs. This study re-described *Philopona vibex* and provides notes on its biology based on the reared insects.

MATERIALS AND METHODS

For rearing studies, larvae were placed in small glass containers (diameter 142 mm × height 50 mm) with cuttings from their host plants. When mature larvae began searching for pupation sites, they were transferred to smaller plastic containers (diameter 90 mm × height 57 mm) filled with moist soil (about 80% of container volume).

For delimiting variability of diagnostic characters, at least one pair from each locality or color form was examined. Length was measured from the anterior margin of the eye to the tip of elytra, and width at the greatest width of the elytra.

Specimens from the study are deposited in the following collections and institutions: Haruki Suenaga Private Collection (HSC), Okayama, Japan; Museum für Naturkunde, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung an der Humboldt-Universität zu Berlin (MNHUB), Berlin, Germany; The Natural History Museum (NHMUK), London, UK; Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Taichung City, Taiwan, ROC.

Exact label data are cited for the type specimen; a double slash (//) divides the data on different labels and a single slash (/) divides the data in different rows. Other comments and remarks are in square brackets: [p] preceding data are printed, [h] preceding data are handwritten, [b] blue label, [w] white label, [r] red label and [y] yellow label.

RESULTS

Philopona vibex (Erichson, 1834)

Haltica vibex Erichson, 1834: 273 (China).

Sebaethe vibex: Gemminger & Harold, 1876: 3519.

Oedionychis (*Philopona*) *vibex*: Heikertinger, 1922: 56.

Oedionychus [sic!] (*Philopona*) *vibex*: Csiki, 1940: 452 (catalogue); Chûjô & Kimoto, 1961: 187 (host plant).

Philopona vibex: Chen, 1934: 286 (Vietnam); Chûjô, 1936: 15 (Taiwan); Chen, 1939: 40 (China: Guanxi); Gressitt & Kimoto, 1963: 799 (China: Inner Mongolia, Sichuan, Hubei, Fujian, Guandong); Kimoto, 1965: 432 (catalogue); Scherer, 1969: 175 (catalogue); Medvedev, 1972: 185 (Sri Lanka); Kimoto & Takizawa, 1994: 478 (larval morphology and biology); Yu *et al.*, 1996: 255 (catalogue); Kimoto, 2000: 126 (Thailand); Lee & An, 2001: 174 (Korea); Hua *et al.*, 2014: 81 (larval morphology and its phylogenetic implications); Yang *et al.*, 2015: 372 (China: Beijing, Shaanxi, Jiangxi, Yunnan).

Oedionychis (*Philophona*) *vibex* var. *nigrodorsatus* Heikertinger, 1922: 58 (Japan: Kyoto); Chûjô & Kimoto, 1961: 187 [as synonym of *Oedionychis* (*Philophona*) *vibex*].

Oedionychus [sic!] (*Philopona*) *vibex* ab. *nigrodorsatus* Csiki, 1940: 452.

Philopona vibex ab. *limbatus* Weise, 1922: 123 (Japan: Kyoto); Chûjô, 1936: 17 (Japan: Honshu).

Oedionychus [sic!] (*Philopona*) *vibex* ab. *chujoi* Csiki, 1940: 452 (new name for *Philopona vibex* ab. *limbatus* Weise); Chûjô & Kimoto, 1961: 187 [as synonym of *Oedionychis* (*Philophona*) *vibex*].

Philopona vibex ab. *luzonica* Weise, 1922: 123 (Philippines: Luzon).

Philopona vibex var. *nigra* Chûjô, 1951: 44 (Japan: Shikoku); Chûjô & Kimoto, 1961:

187 [as synonym of *Oedionychis* (*Philophona*) *vibex*].

Aedionychis [sic!] *japonicus* Baly, 1874: 189 (Japan: Nagasaki); Jacoby, 1896: 261 (India: Belgaum); Heikertinger, 1922: 47 (as synonym of *Oedionychis vibex*); Maulik, 1926: 156 (as synonym of *P. signata*).

Philopona vibex ab. *japonicus*: Weise, 1922: 123; Chûjô, 1936: 16 (Japan: Honshu, Kyushu).

Oedionychus [sic!] (*Philopona*) *vibex* ab. *japonicus*: Csiki, 1940: 452.

Hyphasis signata Duvivier, 1892: 420 (India: Konbir).

Philopona signata: Maulik, 1926: 155 (faunistic records in India); Chûjô, 1936: 15 (as synonym of P. vibex).

Type specimen. *Haltica vibex*. Holotype (sex undetermined, MNHUB, by monotypy): "5041 [p, w] // Haltica / vibex / Er. / China / Meyen [h, y] // vibex / Er. * / China, Japon [h, y] // Hist.-Coll. (Coleoptera) / Nr. 5041 / Haltica vibex Er.* / China. Meyen / Zool. Mus. Berlin [p, y] / SYNTYPE / Haltica / vibex / Erichson, 1834 / labelled by MFNB 2018 [p, r]".

***Aedionychis japonicus*.** Three syntypes are deposited at the NHMUK. Lectotype and paralectotypes is designated here for maintaining its nomenclatural stability since it was confused with other names. One bears a type label (holotype), but it is not the holotype. No holotype was originally designated by Baly (1874). It is designated as the lectotype (sex undetermined), with following labels: "Type / H.T. [p, w, circle label with red border] // Japan [h, w] // Baly Coll. [p, w] // *Aedionychis* / *Japonicus* / Baly / Japan [h, w] // Examined [h] / K. Prathapan / 2005 [p, w]". Paraletotype: 1 (sex undetermined): "Japan [h, w] // Baly Coll. [p, w]". The third specimen with black elytra (e.g., Fig. 6) and same labels as the second one was labeled as var. A. However, it was not mentioned in the original paper.

Specimens examined. CHINA. Jiangxi: 1♂ (TARI), 27.VIII.1936; **Yunnan:** 1♂ (TARI), 西雙版納 (Xishuangbanna), 小勐養 (Xiaomengyang), 22.VIII.1958; 1♀ (TARI), 金平 (Jingping), 猛喇 (Mengla), 14.IV.1956, leg. 黃克仁 (Ke-Ren, Huang) **JAPAN. Hokkaido:** 1♀ (HSC), Kamoenai-mura, Akaishi-mura Oomori, 13.VII.2011, leg. H. Suenaga; 1♀ (HSC), Shiriuchi-machi, Shiriuchi, 10.V.2000, leg. H. Yoshitomi; **Honshu:** 1♀ (HSC), Aomori, Ajigasawa-cho, Hitotumori-cho, Sauchisaw, 2.VI.2012, leg. H. Suenaga; 1♀ (HSC), Aomori, Fukaura-cho, Oirase, 2.VI.2012, leg. H. Suenaga; 1♂ (TARI), Gunma, Minakami-machi, Tanigawadake, 7.VI.2008, leg. S. Sejima; 1♂ (TARI), Okayama, Kagamino-cho, Doi, 20.VIII.2002, leg. Y. Sejima; 1♀ (TARI), same but with "9.VI.2003"; 2♀♀ (HSC), Toyama, Yatsui-machi, Oonagatani, 4.V.2009, leg. H. Suenaga; **Kyushu:** 1♀ (HSC), Oita, Hita-shi, Kamagase-rindo, 4.V.2013, leg. H. Suenaga; **TAIWAN. Ilan:** 1 ex., Toucheng (頭城), 17.V.2009, leg. H.-J. Chen; 1 ex., Yuanshan (員山), 17.V.2009, leg. H.-J. Chen; **Pingtung:** 1♀ (TARI), Koshun (= Henchun, 恆春), 25.IV.-25.V.1918, leg. J. Sonan, determined and recorded by Chûjô (1936); **Taipei:** 1 ex., Kuantu (關渡), 2.III.2016, leg. S. F. Yu; 1 ex., Chihshanyan (芝山岩), 3.III.2016, leg. S. F. Yu; 4 exs., same locality, 5.III.2016, leg. S. F. Yu & M. H. Tsou; 50 exs., reared from eggs laid by females collected from Chihshanyan (芝山岩), leg. M. H. Tsou.

Redescription. Length 4.2–5.2 mm, width 2.1–2.7 mm. General color (Figs. 1–2) yellowish brown; antennae blackish except two basal tarsomeres; prosternum brown; meso- and metathoracic ventrites black; abdominal ventrite I basally darkened; legs dark brown, with tibiae darker apically; vertex and pronotum with median longitudinal dark band; scutellum black; elytra with black stripe along suture, with one additional longitudinal, wide, black stripe arising from humeral calli, reduced at apical 1/3. Vertex with extremely coarse punctures, medially reduced. Antennae moniliform in males (Fig. 7), but antennomeres III–V slender, XII elongate, length ratios of antennomeres I–XI 1.0 : 0.5 : 0.7 : 0.4 : 0.4 : 0.4 : 0.5 : 0.5 : 0.5 : 0.5 : 0.7, length to width ratios of antennomeres I–XI 2.4 : 1.5 : 2.8 : 1.5 : 1.8 : 1.5 : 1.6 : 1.7 : 1.5 : 1.4 : 2.1; similar in females (Fig. 8), antennomeres III–X straight, length ratios of antennomeres I–XI 1.0 : 0.5 : 0.6 : 0.5 : 0.5 : 0.4 :

0.5 : 0.5 : 0.6 : 0.6 : 0.9, length to width ratios of antennomeres I–XI 2.2 : 1.8 : 2.6 : 1.7 : 1.7 : 1.4 : 1.4 : 1.5 : 1.6 : 1.5 : 2.6. Pronotum transverse, 2.1× wider than long, disc with sparse, minute punctures, lateral margin moderately rounded; apical and basal margins subtruncate, laterally depressed at basal margin. Elytra oblong, 1.4× longer than wide; disc with sparse, minute punctures. Apical margin of abdominal ventrite V in males rounded and slightly depressed at sides (Fig. 13), with internal median longitudinal ridge; similar in females, but median longitudinal ridge reduced (Fig. 14). Penis (Figs. 9–10) broad, 2.9× longer than wide; dorsal median process longitudinal, lateral margin medially concave, with erect, hook-like process at middle, directed anteriorly; oblique dorsal process adjacent to dorsal median process, apically narrowed; dorsal lateral sclerites slender, apically connected to apical median sclerites; with triangular process at middle of apical median sclerite; ventral apex reaching apical median sclerites, slightly depressed. Gonocoxae (Fig. 12) separate, moderately sinuate at apical 1/3, base subtruncate, each bearing 4–5 setae apically. Ventrite VIII (Fig. 11) broad apically; spiculum short and basally broadened. Receptacle of spermatheca (Fig. 15) strongly swollen; pump much smaller, with angular process at apex; distal spermathecal duct sclerotized, extremely long.

Variation. Japanese populations display great variation in color patterns. Some specimens are similar to the typical form, but with dark brown heads and black abdomens (Figs. 3–4). Some possess reduced dark bands on the pronotum and variably reduced bands on the elytra (Fig. 5). Some possess dark stripes on the elytra that extend mesally and connect with the suture, lack the median longitudinal black stripe of the pronotum, and possess black heads with yellowish brown clypeus, frons and base of vertex (Fig. 6).

Host plants. Plantaginaceae: *Plantago asiatica* L. (Chûjô & Kimoto 1961; present study, Japan, Taiwan); Verbenaceae: *Vitex negundo* L. (Yu *et al.* 1996; Hua *et al.* 2014, China); Acanthaceae: *Hygrophila pogonocalyx* Hayata and *H. salicifolia* (Vahl) Nees (present study, Taiwan).

Biology. *Philopona vibex* populations are presumably univoltine. The following life cycle information is based on our (TCRT) observations. Females deposited an average of four to six eggs in each egg mass (Fig. 18) during early March. Larvae hatched in 12–23 days. The larvae fed on leaves and the period of different larval instars varied greatly, probably due to variation in temperature. First instar (Fig. 19) duration was 4–13 days, second was 2–5 days and third was 4–6 days. Mature larvae (Fig. 20) burrowed into soil and built underground chambers for pupation. Duration of the pupal stage (Fig. 21) was 13 days.

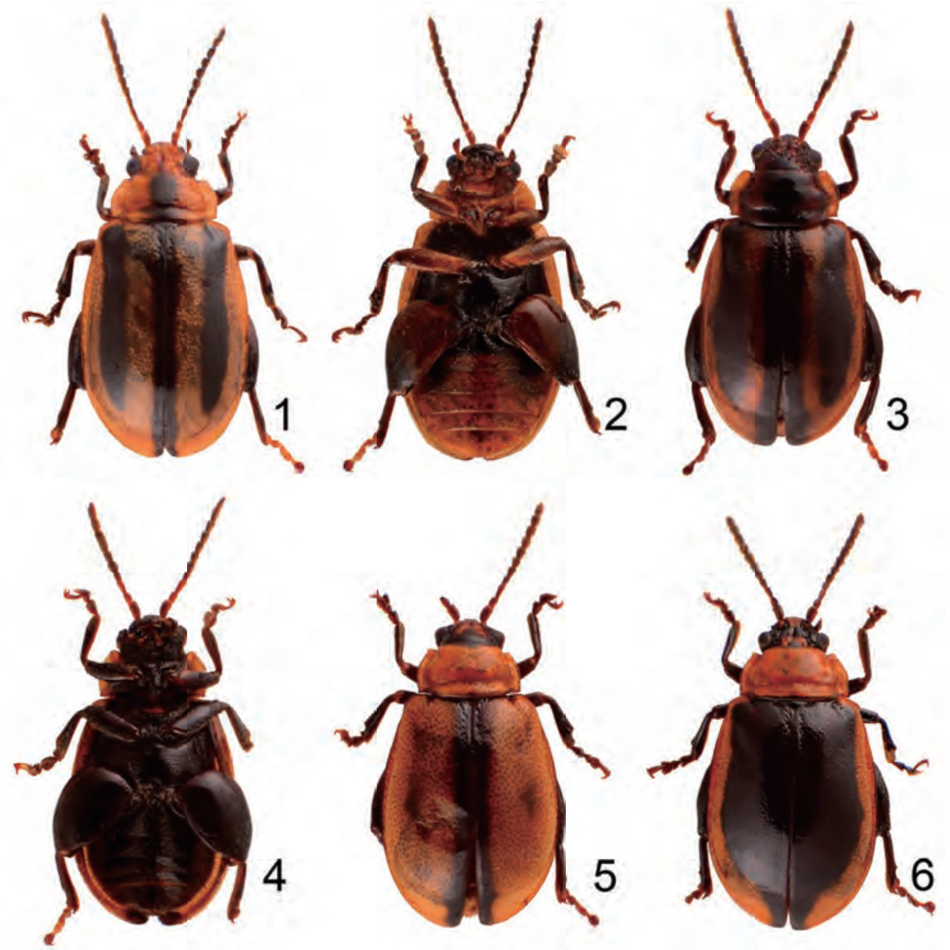
Distribution. China, India, Japan, Korea, Philippines, Sri Lanka, Thailand, Taiwan and Vietnam.

DISCUSSION

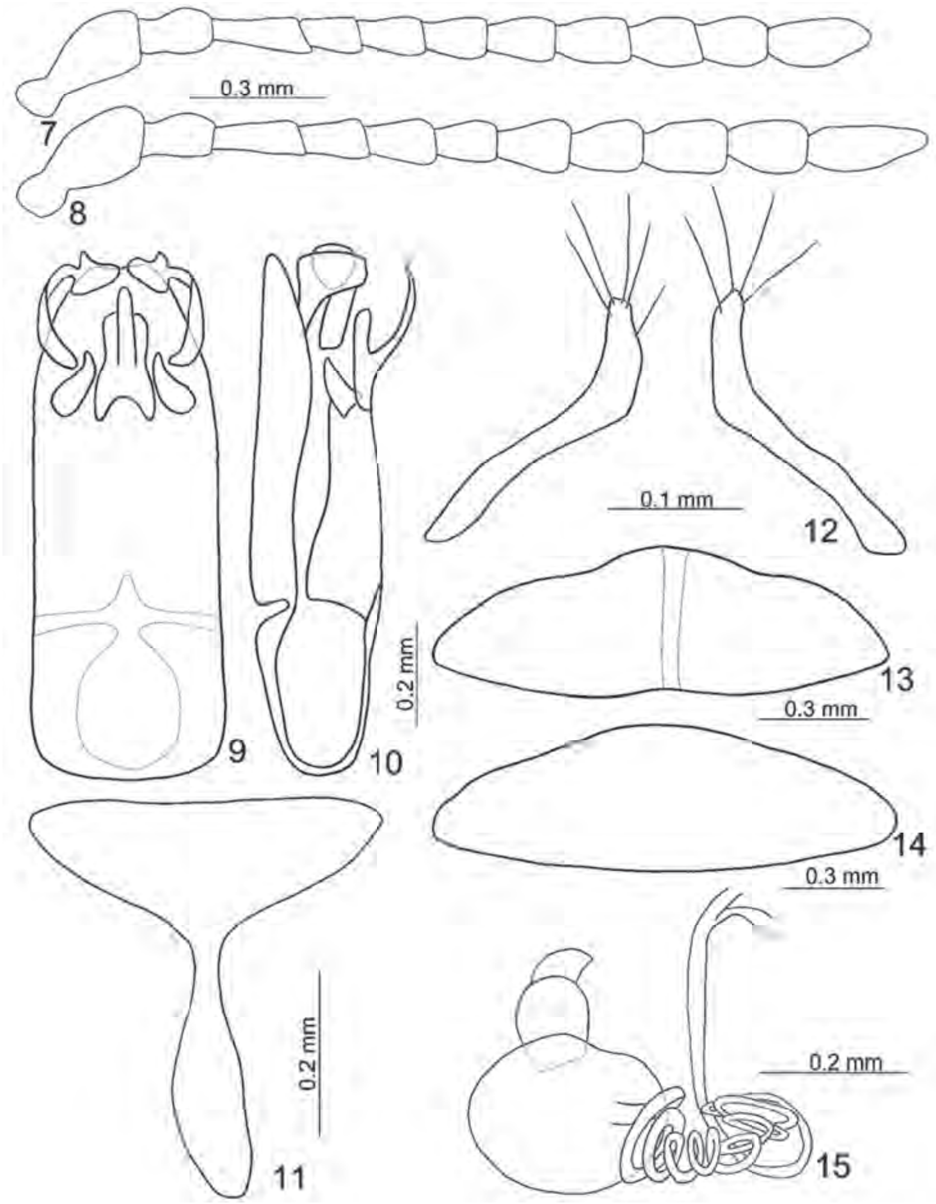
Many synonyms of *Philopona vibex* are found in literature, probably due to the broad distribution and variations in color patterns. Two color patterns within Japanese populations that differ from the typical form of *P. vibex* has prompted a number of names, including *P. japonicus* (Baly 1874), *P. vibex* var. *nigrodorsatus* (Heikertinger 1922), *P. vibex* ab. *limbatus* Weise, 1922, and *P. vibex* var. *nigra* Chûjô, 1951. Based on examination of specimens from China, Japan and Taiwan, the results confirm that these names are synonyms. As for those names from other countries, such as *P. vibex* ab. *luzonica* Weise, 1922 from Philippines and *P. signata* Duvivier, 1892 from India, further study is required.

Populations of *Philopona vibex* seem uncommon in Taiwan probably because of the

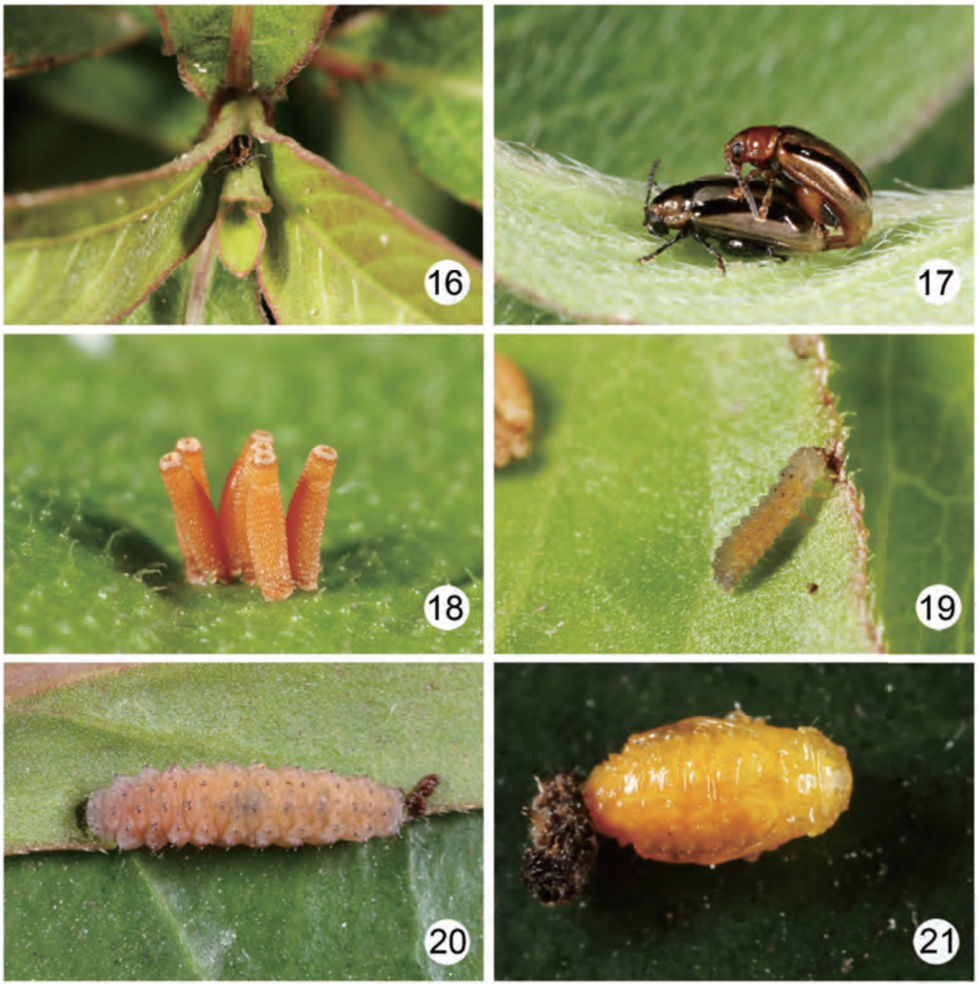
host plants. Although *Plantago asiatica* L. is extremely common in Taiwan, observations of *Philopona vibex* feeding on this plant are too few to confirm whether it is the preferred host. Based on the laboratory rearing, *Hygrophila pogonocalyx* and *H. salicifolia* are its preferred hosts because females oviposited on it, and larvae fed on the leaves and successfully completed development. Both plant species are endemic semiaquatic plants in Taiwan, wild populations have become critically endangered due to wetland destruction and degradation. This is especially true for *H. pogonocalyx*, with only small wild populations left in wetlands along the coasts of Taichung City in western Taiwan (Wang *et al.* 2000). The plant has been widely cultivated all over Taiwan for restoration purposes since 1997, populations of *Philopona vibex* could be expanding with close association of the host plant.



Figs. 1–6. Habitus of adult *Philopona vibex*. 1. Female, from Taiwan, dorsal view; 2. Ditto, ventral view; 3. Female, color variation, from Japan, dorsal view; 4. Ditto, ventral view, color variation; 5. Female, color variation, from Japan, dorsal view; and 6. Female, color variation, from Japan, dorsal view.



Figs. 7–15. Diagnostic characters of *Philopona vibex*. 7. Antenna, male; 8. Antenna, female; 9. Penis, dorsal view; 10. Penis, lateral view; 11. Ventrite VIII, female; 12. Gonocoxae; 13. Ventrite V, male; 14. Ventrite V, female; and 15. Spermatheca.



Figs. 16–21. Life stages on *Hygrophila pogonocalyx*. 16. Adult hiding under young shoots of host plants; 17. Mating pair; 18. Eggs; 19. First-instar larva; 20. Third-instar larva; and 21. Pupa.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the TCRT for collecting materials, including Hou-Jay Chen and Su-Fang Yu. We thank Haruki Suenaga for providing Japanese specimens, and Ming Bai and Young-Ying Ruan for Chinese specimens. We especially thank Bernd Jaeger for taking images of the type of *Haltica vibex* Erichson, 1834, Michael Felix Geiser for types of *Aedionychis japonicus*. Chih-Kai Yang for identification of host plants, and Chang Chin Chen for assisting our study in various ways. Special thanks are due to Chris Carlton for reading the draft and editing for American English style. This study was supported by the project "Agricultural Long-Term Ecological Monitoring Project of Taiwan (109DP-9.3-CI-02)" sponsored by TARI.

REFERENCES

Baly, J. S. 1874. Catalogue of the Phytophagous Coleoptera of Japan, with descriptions of the species new to science. Trans. Ent. Soc. 22:161–217. doi:10.1111/j.1365-2311.1874.tb00164.x

Chen, S. H. 1934. Revision of the Halticinae (Col. Chrysomelidae) of Yunnan and Tonkin. Sinensia 5:225–416.

Chen, S. H. 1939. Flea beetles collected at Kwangsi. Sin-

ensia 10:20–55.

Chûjô, M. 1936. Studies on the Chrysomelidae in the Japanese Empire (VIII), subfamily Halticinae (4). Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa 26:15–30.

Chûjô, M. 1951. Chrysomelid-beetles of Shikoku, Japan (II) (Coleoptera). Trans. Shikoku Entomol. Soc. 2:31–48.

Chûjô, M. and S. Kimoto. 1961. Systematic catalog of Japanese Chrysomelidae (Coleoptera). Pac. Insects 3:117–202.

Csiki, E. 1940. [new name]. p.337–635. *in*: Chrysomelidae: Halticinae. (Heikertinger, F. and E. Csiki, eds.) W. Junk. s-Gravenhage, the Netherlands. 326 pp. (in Latin)

Duvivier, A. 1892. Les phytophages du Chota-Nagpore (2e Note). Ann. Soc. Entomol. Belg. 36:296–449.

Erichson, W. F. 1834. Coleopteren. p.217–308. *in*: Beiträge zur Zoologie, gesammelt auf einer Reise um die Erde. (Meyen, F., ed.) Vol. 16. Suppl. Acad. Caes. Leop. Nova Acta. Academia Caesarea Leopoldino-Carolina Naturae Curiosorum. Berlin, Germany. 312 pp. (in Polish)

Gemminger, M. and E. von Harold. 1876. Catalogus Coleopterorum hucusque descriptorum synonymicus et systematicus. Tom XII. Chrysomelidae (Part II), Languridae, Erotylidae, Endomychidae, Coccinellidae, Corylophidae, Platypsyllidae. Sumptu T. Ackermann. Munich, Germany. 344 pp. (in German)

Gressitt, J. L. and S. Kimoto. 1963. The Chrysomelidae (Coleoptera) of China and Korea. Part 2. Pac. Insects Monogr. 1B:301–1026.

Heikertinger, F. 1922. Die mit *Oedionychis* verwandten paläarktischen Halticinen (Coleopt.). Wien. Entomol. Ztg. 39:45–64.

Hua, Y., R. G. Beutel, S. Q. Ge, R. E. Nie, and X. K. Yang. 2014. The morphology of galerucine and alticine larvae (Coleoptera: Chrysomelidae) and its phylogenetic implications. Arthropod Syst. Phylo. 72:75–94.

Jacoby, M. 1896. Descriptions of the new genera and species of phytophagous Coleoptera obtained by Mr Andrewes in India. Part II. Chrysomelinae, Halticinae and Galerucinae. Ann. Soc. Entomol. Belg. 40:250–304. doi:10.5962/bhl.part.2024

Kimoto, S. 1965. The Chrysomelidae of Japan and the Ryukyu Islands. IX. Subfamily Alticinae II. J. Fac. Agric. Kyushu Univ. 13:431–459.

Kimoto, S. 2000. Chrysomelidae (Coleoptera) of Thailand, Cambodia, Laos and Vietnam. VII. Alticinae. Bull. Inst. Comp. Stud. Intl. Cult. Soc. 26:103–299.

Kimoto, S. and H. Takizawa. 1994. Leaf Beetles (Chrysomelidae) of Japan. Tokai Univ. Press. Tokyo, Japan. 539 pp.

Konstantinov, A. S. and N. J. Vandenberg. 1996. Handbook of Palearctic flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). Contrib. Entomol. Intl. 1:233–439.

Lee, J. E. and S. L. An. 2001. Economic Insects of Korea 14: Chrysomelidae (Coleoptera). Korea Institute of Science and Technology. Seoul, Korea. 229 pp. (in Korean with English abstract)

Maulik, S. 1926. The Fauna of British India, Including Ceylon and Burma. Coleoptera. Chrysomelidae (Chrysomelinae and Halticinae). Taylor and Francis. London, UK. 458 pp.

Medvedev, L. N. 1972. Chrysomelidae from Ceylon Coleoptera. Ent. Arb. 23:178–185.

Scherer, G. 1969. Die Alticinae des indischen Subkontinentes (Coleoptera-Chrysomelidae). Pac. Ins. Mon. 22:1–251.

Wang, W. K., C. Q. Huang, and T. Y. Chiang. 2000. Population differentiation and conservation of *Hygrophila pogonocalyx*. Nat. Conserv. Quar. 31:54–59. (in Chinese)

Weise, J. 1922. Chrysomeliden der Indo-Malaysichen Regions. Tijdschr. Entomol. 65:39–130.

Yang, X. K., S. Q. Ge, R. E. Nie, Y. Y. Ruan, and W. Z. Li. 2015. Chinese Leaf Beetles. Science Press. Beijing, China. 507 pp. (in Chinese)

Yu, P. Y., S. Y. Wang, and X. K. Yang. 1996. Economic Insect Fauna of China. Fasc. 54. Coleoptera: Chrysomeloidea (II). Science Press. Beijing, China. 324 pp. (in Chinese)

台灣產縱紋胖爪葉蚤的再次發現與生物學注解 (鞘翅目：金花蟲科：螢金花蟲亞科：葉蚤族)

李奇峰[1,*] 曹美華[2]

摘要

李奇峰、曹美華。2020。台灣產縱紋胖爪葉蚤的再次發現與生物學注解 (鞘翅目：金花蟲科：螢金花蟲亞科：葉蚤族)。台灣農業研究 69(4):265–273。

縱紋胖爪葉蚤 [*Philopona vibex* (Erichson, 1834)] 是廣泛分布於亞洲的葉蚤，過去在台灣僅有楚南仁博在1918 年採得的一隻標本紀錄。台灣金花蟲研究團隊從 2005 年開始普查台灣的金花蟲，藉由發現此葉蚤的偏好食草而找到穩定的族群；本文檢查了中國、日本及台灣的縱紋胖爪，對其重新描述，並針對診斷特徵描繪線圖，包括觸角、雄性生殖器、雌蟲生殖突基節、雌蟲受精囊、雙性的第五腹節及雌蟲的第八腹節腹板；生活史紀錄則是基於由親蟲產卵開始飼養至 50 隻子代成蟲所得的結果，並根據野外觀察與飼養經驗所得之生物學特性來探討此蟲何以在台灣如此稀少的原因。

關鍵詞：金花蟲、分類學、水蓑衣、內囊骨。

投稿日期：2020 年 5 月 18 日；接受日期：2020 年 7 月 9 日。
* 通訊作者：chifeng@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。
2 公民科學家。台灣 台北市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(4):274–285 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202012_69(4).0002 研究報告

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* Race 1/Biovar 1/Phylotype II/Sequevar 7) 引起之番茄青枯病

蔡佳欣 [1,*] 黃淑苓 [2] 李佳蓉 [2] 林靜宜 [3] 呂昀陞 [1]

摘要

蔡佳欣、黃淑苓、李佳蓉、林靜宜、呂昀陞。2020。青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* race 1/biovar 1/phylotype II/sequevar 7) 引起之番茄青枯病。台灣農業研究 69(4):274–285。

宜蘭縣地區一處番茄栽植田於 2016–2017 年出現番茄植株生長不良及萎凋現象，萎凋之番茄植株枝葉仍呈青綠色，與青枯病徵狀相似。將罹病番茄莖部切開，可見維管束組織褐化蔓延，從病組織可在 triphenyl tetrazolium chloride 培養基分離出與青枯病菌相似的中間粉紅色，周圍白色流質狀之細菌菌落。該細菌分離株經生理生化特性分析、Biolog 細菌鑑定系統測試、16S rDNA 序列比對、青枯病菌專一性引子對，將該分離株鑑定為 *Ralstonia solanacearum*。進一步再經寄主範圍測試、生化型測試、青枯病菌演化型鑑別之引子對及親緣關係分析，將其歸類為第 1 生理小種 (race 1)/ 第 1 生化型 (biovar 1)/ 第 2 演化型 (phylotype II)/ 第 7 序列變種 (sequevar 7)。又將該分離株進行科霍氏法則試驗，接種番茄植株後可造成與田間所見相同之萎凋病徵，並從罹病植物再分離出相同的第 2 演化型青枯病菌。該分離株尚無在台灣危害番茄的紀錄，此為青枯病菌第 1 生理小種/第 1 生化型/第 2 演化型/第 7 序列變種感染番茄在台灣的首度報導。

關鍵詞：青枯病菌、第 1 生理小種、第 1 生化型、第 2 演化型、第 7 序列變種。

前言

植物青枯病 (bacterial wilt) 為青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起之維管束病害，該分離株為全球重要的植物病原細菌，寄主範圍極為廣泛，高達 250 種植物以上 (Peeters *et al*. 2013)。在台灣該分離株已經被報導感染許多植物，尤其在番茄、甜椒等茄科作物之青枯病，普遍在台灣各地發生，造成番茄植株枯萎及減產的嚴重經濟損失。由於青枯病菌在全球地理分布廣、基因歧異度高，被認為是由許多不同菌系所組成的複合種 (species complex)。在傳統上青枯病菌菌系的區分，有 2 種方式：第 1 種方式為利用寄主範圍將青枯病菌區分為 5 個生理小種 (race) (Buddenhagen *et al*. 1962; He *et al*. 1983)；第 2 種方式是以青枯病菌利用及氧化碳水化合物的能力，將其區分為 6 種生化型 (Hayward 1964, 1994; Denny 2006)。之後隨著分子生物學的發展，Fegan & Prior (2005) 提出演化型 (phylotype) 的分類系統，以設計自 16S–23S 核糖體核酸基因間之內轉錄區 (internal transcribed spacer; ITS) 之引子進行複合式聚合酶連鎖反應 (multiplex polymerase chain reaction; multiplex PCR) 可將青枯病菌區分為 4 個演化型，此演化型的分類系統與地理起源相關。此外，利用青枯病菌內切葡聚糖酶基因 (endoglucanase; *egl*) 的部分序列進行親緣關係分析，可進一步再將青枯病菌區分為不同的序列變種 (sequevar)，每個演化型均由多個序列變種所組成。

投稿日期：2019 年 3 月 28 日；接受日期：2020 年 7 月 1 日。
* 通訊作者：tsaich@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。

2016–2017 年期間在宜蘭縣壯圍鄉 1 處番茄栽植田，部分植株出現萎凋，初期罹病株在白天正午時分，葉片呈現下垂 (圖 1A)，傍晚時恢復。數日之後植株病勢加重，出現萎凋徵狀，無法恢復，受害之番茄植株枝葉仍呈青綠色，與青枯病徵狀相似 (圖 1B)，該田區發病率達 30% 以上。縱切番茄莖部，可見番茄維管束褐化蔓延 (圖 1C)，將罹病組織置於光學顯微鏡下觀察，可見大量細菌湧出，疑似細菌性病害。採集萎凋番茄病株後，切取番茄莖部罹病組織抽取植物總核酸，以青枯病菌專一性引子以及鑑別青枯病菌演化型之引子進行 multiplex PCR 快速診斷分析後發現，所採集之罹病番茄植株樣本，絕大多數已被青枯病菌感染，因此推測該田區番茄萎凋徵狀應為該分離株所引起。同時，在 multiplex PCR 演化型鑑別結果中發現，該田區番茄罹病株，部分病株組織內偵測到第 1 演化型 (phylotype I) 青枯病菌感染，部分植株卻出現第 2 演化型 (phylotype II) 青枯病菌訊號。由文獻資料可知，第 1 演化型青枯病菌為台灣最常見的青枯病菌系，分布在台灣各地，感染許多種植物。第 2 演化型青枯病菌在台灣目前僅在馬鈴薯上發現 (Wu *et al.* 2011)，尚無第 2 演化型青枯病菌感染番茄的紀錄，為瞭解出現在罹病番茄植株之第 2 演化型青枯病菌特性。本試驗擬從罹病番茄植株分離該第 2 演化型青枯病菌進行鑑定，並對其進行寄主範圍測試、生理生化特性以及核酸序列分析，以釐清該青枯病菌菌株分類地位。

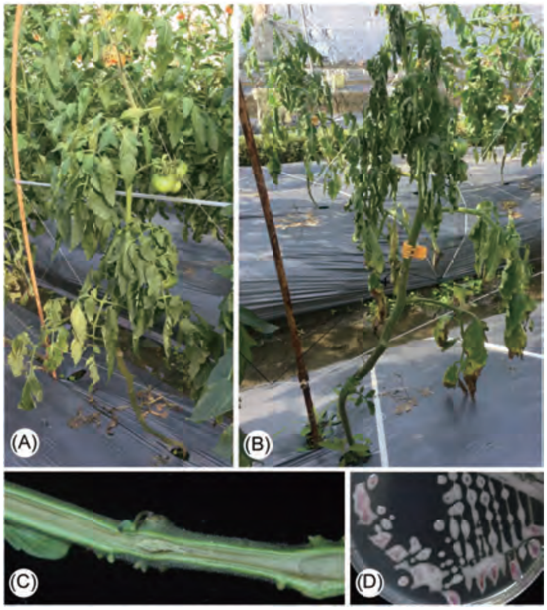


圖 1. 番茄青枯病。(A) 番茄病株葉片下垂；(B) 番茄發病嚴重，整株萎凋；(C) 莖部維管束褐化；(D) 病原細菌在 triphenyl tetrazolium chloride 培養基上的菌落型態。

Fig. 1. Bacterial wilt of tomato. (A) Diseased tomato plant showing drooping leaves; (B) the whole plant wilt in the severe diseased tomato; (C) the browning of vascular tissues; and (D) the bacterial colony morphology on triphenyl tetrazolium chloride medium.

材料與方法

番茄植株核酸抽取與 multiplex PCR 快速診斷

將採集自宜蘭縣壯圍鄉，疑似受到青枯病菌感染之番茄罹病株，切取罹病株莖部在 1% 次氯酸鈉中浸泡 30 s，進行表面消毒之後，再以無菌水清洗 3 次。再將莖部組織以刀片切碎，之後將組織碎片放置在無菌水中釋放細菌。核酸萃取方法參考 Wang *et al.* (1993) 所述略為修改後，先吸取細菌懸浮液 50 µL 與 0.4 N NaOH 50 µL 混合均勻後靜置 10 min，再加入 100 µL 的 1 M Tris-HCl 震盪混合均勻。吸取 20 µL，以無菌水稀釋 10× 製備成 multiplex PCR 的反應模板。Multiplex PCR 參考 Fegan & Prior (2005) 所述，以 5 條設計自青枯病菌 16S–23S rRNA gene intergenic spacer region (ITS) 區域之引子 (Nmult21 : 1F, Nmult21 : 2F, Numlt23 : AF, Nmult22 : InF, Numlt22 : RR) 鑑別其演化型，並配合青枯病菌專一性引子 AU759f/AU760r (Opina *et al.* 1997) 一起進行 multiplex PCR 檢測。Multiplex PCR 反應條件如下：各反應物的總體積為 25 µL，包括濃度 1× PCR buffer、1.50 mM 的 $MgCl_2$、0.25 mM 的 dNTP，Taq DNA polymersase 0.3 units、引子 Numlt23 : AF 為 40 ng，其餘的引子濃度皆為 20 ng，並加入 2 µL 模板。PCR 在熱循環反應器 (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems^{TM}, Leicestershire, UK) 內進行，PCR 溫度循環條件：先以 96℃進行 5 min；再以 94℃進行

1 min，59℃進行 1 min，72℃進行 2 min 共 30 循環；最後 72℃進行 10 min。PCR 產物以 2.0% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析，植株檢測的電泳圖譜結果依據 Fegan & Prior (2005) 所述，分析植株是否被青枯病菌感染及其演化型。

病菌分離

以移植環沾取上述由番茄組織所釋放的細菌懸浮液，用畫線平板的方式將細菌懸浮液塗在 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 培養基上 (Kelman 1954)，培養基在 28℃定溫箱培養 2 d 後挑選單一菌落至新培養基培養及純化。並挑選來自不同番茄植株之細菌分離株，冷凍保存在實驗室，供後續進一步鑑定菌株種類。

Biolog 鑑定

隨機挑選分離自不同的罹病番茄植株之 3 株細菌分離株，分別編號為 TBW01 (2016 年分離所得)、TBW02 及 TBW03 (2017 年分離所得)，以 Biolog 鑑定系統進行鑑定。先將 3 株細菌分離株培養在 5.7% BUG™ agar (Biolog Universal Growth Agar, Biolog Inc., Hayward, CA, USA) 培養基，置於 30℃定溫箱培養 16–24 h。待細菌長出後，以 IF-A 接種液 (Biolog Inc., Hayward, CA, USA) 將細菌懸浮，並將細菌懸浮液震盪混合均勻。細菌懸浮液濃度以波長 590 nm 之濁度計 (Turbidity, Biolog Inc., Hayward, CA, USA) 調整至 90–98% T (turbidity)。之後將細菌懸浮液加入 Biolog GEN III 反應盤 (Biolog Inc., Hayward, CA, USA) 中，每個孔加入 100 µL 細菌懸浮液，培養 25–35 h，以光譜儀測讀。所得資料以 Biolog MicroLog™ 3 ver. 5.2.2 系統及 Biolog GEN III 資料庫 2.6.1 版分析，以鑑定細菌種類。

16S rDNA 序列分析

將細菌分離株 TBW01 與 TBW02 進行核酸萃取，細菌核酸萃取方法參考 Wang *et al*. (1993) 所述略為修改後進行。首先以滅菌牙籤沾取已純化之單一細菌菌落後，將細菌懸浮至 20 µL 無菌水中，然後加入 0.4 N NaOH 20 µL 與之混合。靜置 10 min 後，再加入 40 µL 的 1 M Tris-HCl 震盪混合均勻後，取 20 µL 以無菌水稀釋 10× 即可作為 PCR 的反應模板。萃取細菌核酸之後，以細菌 16S rDNA 通用引子對 f8-27/r1510 (Lipson & Schmidt 2004) 進行 PCR，增幅之 PCR 產物以 1.4% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析，比較是否增幅出預期 DNA 片段。預期大小之 DNA 片段以 T&A™ cloning kit (Yeastern Biotech, Taipei, Taiwan) 將目標 DNA 片段選殖至大腸桿菌質體，確認預期之目標 DNA 片段的轉殖成功後，將該轉殖菌株委由生物科技公司進行 DNA 序列定序，所得資料在美國國家生物技術信息中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 網站進行比對。

生理小種測定

為測定本次分離所得之青枯病菌的生理小種，參考 Buddenhagen *et al*. (1962) 及 He *et al*. (1983) 所述進行接種測試，先將上述 3 株分離株在 TTC 培養基在 28℃定溫箱培養 2 d 之後，以無菌水懸浮，利用分光光度計 (spectrophotometer, Spectronic 70, Bausch & Lomb., Bridgewater, NJ, USA)，波長 600 nm，將細菌懸浮液之吸收值調整至 0.3 (濃度約 10^8 cfu mL^{-1})，作為接種源。試驗植物包含「農友 301」番茄、「農友金華星」甜椒、「麻糬長茄」茄子、「克尼伯」馬鈴薯之 4 種茄科植物及「台農 7 號」花生。接種方式為先滴 1 滴製備好的細菌懸浮液至試驗植物莖部後，以滅菌針頭穿刺莖部製造傷口供細菌感染，3 分離株對上述試驗植物各接種 3 株，以接種無菌水的植株作為對照組。接種後之植株套上塑膠袋保濕，48 h 之後打開塑膠袋，放置在 28℃生長箱觀察發病情形，以供生理小種判別。

生理生化特性分析

為瞭解該田區所分離之細菌分離株之生理生化特性，參考 Hayward (1964)、Huang *et al*. (2000)、Schaad *et al*. (2001) 測定上述 3 株細菌分離株之特性，試驗重複 2 次。試驗項目包括有革蘭氏反應 (Gram reaction)，對葡萄糖利用方式 (氧化/發酵試驗；O/F test)、在 King's B 培養基上產生螢光色素的測定、在

YDC (yeast extract-dextrose-$CaCO_3$) 培養基上的菌落型態、氧化酵素 (oxidase)、過氧化氫酵素 (catalase)、尿素酵素 (urease)、精氨酸二水解酵素 (arginine dihydrolase)、苯丙氨酸脫氨酵素 (phenylalanine deaminase)、硝酸鹽之還原能力 (nitrate reduction)、明膠水解作用 (hydrolysis of gelatin)、澱粉水解作用 (hydrolysis of starch)、硫化氫的產生 (production of H_2S)、吲哚的產生 (production of indole) 測定，在 40℃下的生長能力，在分別含有 1.0、1.5 及 2.0% NaCl 之 nutrient broth (NB) 的生長能力。

生化型 (biovar) 測定

為瞭解本次分離所得之 3 株分離株的生化型，參考 Hayward (1964, 1994) 所述，測試 3 株分離株對於 7 種碳水化合物的利用及氧化能力，包括對甘露糖醇 (mannitol)、山梨聚糖醇 (sorbitol)、甜己醇 (dulcitol) 之 3 種六醣醇及海藻糖 (trehalose) 的利用能力；對乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、纖維雙醣 (cellobiose) 之 3 種雙醣的氧化能力。

演化型測定

為瞭解分離所得菌株之演化型，將上述 3 株分離株，進行青枯病菌演化型測定，並將已知為第 1 演化型青枯病菌分離株編號 105137 (來自台中霧峰番茄罹病株) 及已知為第 2 演化型青枯病菌分離株編號 RS1118 (來自嘉義馬鈴薯病株) 作為對照組，以確認本次從宜蘭所分離所得分離株之演化型。分離株核酸以上述細菌核酸抽取方法製備，演化型的測定以上述 multiplex PCR 條件進行，PCR 產物以 2.0% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析後，所得之電泳圖譜結果依據 Fegan & Prior (2005) 判定青枯病菌演化型。

序列變種鑑定

為瞭解本次出現的青枯病菌之序列變種，將上述 3 株分離株以 *egl* 之引子對，Endo-F (ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC) 及 Endo-R (GCGTTGCCCGGCACGAACACC) (Fegan *et al*. 1998) 增幅 *egl* 部分基因序列，PCR 產物如上所述進行 *egl* 基因選殖後，委由生物科技公司定序。所得之分離株基因序列在 NCBI 網站以 BLASTn 比對，並參考文獻從 NCBI 下載不同演化型及序列變種的青枯病菌 *egl* 基因序列，作為參考菌株，進行親緣關係分析 (phylogenetic analysis)。親緣關係分析以 MEGA X 軟體進行，先以該軟體中之 Clustal W 對分離株以及參考菌株之序列進行多序列比對，並整理成一致性序列後，再以鄰近法 (neighbor joining)，1,000 次重複取樣 (bootstrap) 法建立親緣樹狀圖 (phylogenetic tree)，親緣關係分析之參考菌株如表 1。

科霍氏法則測試

將上述 3 株分離株培養在 TTC 培養基，以上述之分光光度計將細菌懸浮液之吸收值調整至 0.3 (濃度約 10^8 cfu mL^{-1}) 作為接種源。試驗植物為種植在盆缽約 3 個月之「農友 301」番茄，以上述之穿刺接種方式接種番茄植株。3 株分離株各接種 3 株番茄，以接種無菌水的番茄植株作為對照組，接種後將番茄植株套上塑膠袋保濕 48 h。之後打開塑膠袋，將其放置在 28℃生長箱觀察記錄發病情形，發病之番茄植株從莖部再分離病原細菌，所分離的細菌以 multiplex PCR 確認是否與接種的分離株相同。

結果與討論

病菌分離

2016 年在田區隨機採集番茄樣品，經由 multiplex PCR 偵測植株青枯病菌，8 株植株可增幅出青枯病菌專一性之 280 bp 片段。其中，1 株罹病番茄檢測到第 2 演化型青枯病菌感染之 372 bp 訊號，7 株番茄植株檢測出第 1 演化型青枯病菌感染之 144 bp 訊號，隔年 (2017 年) 該田區番茄持續發生青枯病。隨機採集得到 17 株番茄青枯病株，經偵測發現有 15 株番茄植株檢測出第 2 演化型青枯病菌，2 株番茄植株為第 1 演化型青枯病菌感染。為瞭解第 2 演化型青枯病菌的特性，將檢測到第 2 演化型青枯病菌感染之番茄罹病株，從莖部分離病原細菌，可在 TTC 培養基平板上分離出與青枯病菌型態相似之中間粉紅色，周圍為白色的流質狀的菌落。因此，將該細菌菌落

表 1. 青枯病菌親緣關係分析之參考菌株。

Table 1. *Ralstonia solanacearum* reference strains for phylogenetic analysis.

Strain	Host	Origin	*egl*-tree Phylotype[z]	Sequevar	GenBank No.
A3909	Heliconia	United States	IIA	6	EF371812.1
ACH732	Tomato	Australia	IV	8	GQ907150.1
AW1	Tomato	Alabama	II	7	KC188082.1
CFBP2957	Tomato	Martinique	IIA	36	AF295265
CFBP734	Potato	Madagascar	IIIa	19	AF295274.1
CIP120	Potato	Peru	IIA	38	GQ907152.1
ICMP7963	Potato	Kenya	IIA	7	AF295263.1
JT516	Potato	Reunion	IIB	1	AF295258.1
J25	Potato	Kenya	III	20	AF295279.1
CFBP2047	Tomato	United States	IIA	7	AF295262.1
MOLK2	Banana	Philippines	IIB	3	EF371841.1
P822	Blueberry	Florida	IIA	7	MF783889.1
Po82	Potato	Mexico	IIB	4	FJ561070.1
Pss81	Tomato	Taiwan	I	14	EU407270.1
Pss358	Tomato	Taiwan	I	15	EU407298.1
Psi7	Tomato	Indonesia	IV	10	EF371804.1
UW21	Banana	Honduras	IIA	6	DQ011546.1

[z] *egl*: endoglucanase.

以移植環移植至新的 TTC 培養基上純化 (圖 1D)，共分離出 22 株分離株。之後該發病田區轉種水稻，在該田區未再繼續收集菌株。從所分離的細菌分離株中隨機挑選 3 株分離自不同植株之分離株，編號為 TBW01、TBW02 及 TBW03，以供進一步鑑定該病菌種類及生物特性等，確認田間番茄罹病植株是否被第 2 演化型青枯病菌株感染。

Biolog 鑑定

將上述分離純化所得與青枯病菌菌落型態相似之 3 株細菌分離株，以 Biolog 鑑定系統進行分析，將 3 株細菌分離株培養在 Biolog GEN III 反應盤，測定該分離株的生理特性及對各種碳素源的利用情形。培養 25–35 h 時，以光譜儀測讀反應盤顏色變化結果，所得讀值資料經 Biolog MicroLog™ 分析及比對資料庫後，3 株細菌分離株，系統顯示與 *R. solanacearum* 相似值最高，相似值分別為 0.738、0.704、0.736，已超過系統設定臨界值 0.5。因此，3 細菌分離株最可能為 *R. solanacearum*。

16S rDNA 序列分析

將細菌分離株 TBW01 及 TBW02，以細菌通用 16S rDNA 通用引子對 f8-27/r1510 進行 PCR。經電泳分析後，2 株分離株均可增幅出約 1,500 bp DNA 片段。將該 DNA 片段成功轉殖至大腸桿菌質體後，進行核酸定序，所得之 2 株分離株 DNA 序列彼此之間相同度為 100%，以 TBW01 之 16S rDNA 序列為代表上傳 NCBI (GenBank accession number MK418540.1)。將該序列在 NCBI 上比對，結果與 *R. solanacearum* strain K60-1 (GenBank accession number NR 044040.1) 以及 *R. solanacearum* LMG 2299 (GenBank accession number EF016361.1) 相同度最高，達 100%。

生理小種測定

為瞭解本次發生的青枯病菌之生理小種，因此進行寄主範圍測試，將上述 3 株分離株，以穿刺方式接種病菌至番茄、甜椒、茄子、馬鈴薯、花生植株。接種 2 d 後，4 種茄科植物包括番茄、甜椒、茄子、馬鈴薯以及非茄科之

花生植株葉片開始發生輕微失水下垂情形，7 d 之後植株陸續出現莖部維管束褐化及葉片失水的萎凋病徵，接種無菌水之對照植株未出現萎凋病徵。

青枯病菌被認為由許多不同的菌系所組成的複合種，這些菌系可依照寄主範圍的差別將其區分為 5 個生理小種。第 1 生理小種可以感染多種茄科植物，包括番茄、甜椒、馬鈴薯、茄子、菸草等以及多種非茄科植物，亦稱為茄科菌系。第 2 生理小種，主要感染 3 倍體香蕉以及赫蕉屬 (*Heliconia*) 植物，亦稱為芭蕉科菌系。第 3 生理小種主要感染馬鈴薯與番茄，稱為馬鈴薯菌系，對其他茄科植物毒性 (virulence) 較低。第 4 生理小種為自菲律賓罹病薑所分離之菌系，只能感染薑，亦稱為薑菌系。第 5 生理小種為從中國大陸罹病桑樹所分離之菌系，主要為害桑樹，對茄子與馬鈴薯病原性較弱，亦稱為桑菌系 (Buddenhagen *et al*. 1962; He *et al*. 1983)。

台灣田間常見的青枯病菌之生理小種，幾乎都是寄主範圍廣泛的第 1 生理小種，僅有在馬鈴薯上發現第 3 生理小種。由本次接種試驗可知，3 株分離株均可對多種茄科作物，包括番茄、甜椒、茄子、馬鈴薯以及非茄科作物花生，造成植株維管束褐化以及萎凋的病徵。因此，3 株分離株依據其寄主範圍較廣泛，並且可對上述多種試驗植物造成萎凋的病徵。符合上述第 1 生理小種特性，因此將該分離株鑑定為第 1 生理小種。

生理生化特性以及生化型測定

為了瞭解本次分離所得青枯病菌之生理生化特性，將上述 3 株分離株測定其生理生化特性及生化型，試驗重複 2 次。3 株分離株測定結果相同，均屬於革蘭氏陰性菌 (gram negative)，好氣性，在 King’s B 培養基上培養無螢光色素產生，在 YDC 培養基上菌落為淡褐色，該分離株在氧化酵素、尿素酵素、過氧化氫酵素及硝酸鹽還原能力測試屬於正反應。在精氨酸二水解酵素、苯丙胺酸脫胺酵素、白明膠水解作用、果聚醣產生、澱粉水解作用、硫化氫的產生、吲哚的產生等，則屬於負反應。另外，該分離株可在含有 1.0% 及 1.5% NaCl 之 NB 下生長，但在 2.0% NaCl 及 40℃下無法生長 (表 2)，其基本生理生化特性與青枯病菌相同。在生化型測定上，所測定的 3 株分離株對下列 7 種碳水化合物測定結果相同，不能氧化乳糖、麥芽糖、纖維雙醣 3 種雙醣，不能利用甘露糖醇、山梨聚糖醇、甜己醇 3 種六醣醇，但可以利用海藻糖。因此，對照 Hayward (1994) 資料，將 3 株分離株歸類為第 1 生化型 (表 3)。

據 Hsu (1991) 及 Lin (2008) 研究，在台灣田間普遍分布，可感染茄科等多種寄主植物的青枯病菌均為第 1 生理小種，且屬於第 3 或第 4 生化型。近年在馬鈴薯上，則有第 3 生理小種/第 2 生化型菌系出現，造成馬鈴薯青枯病的報告 (Wu *et al*. 2011)。本次從宜蘭的萎凋番茄植株所分離之青枯病菌分離株，經上述 7 種碳水化合物進行生化型測定，屬於第 1 生化型，而非台灣田間普遍分布的青枯病菌第 3 及第 4 生化型菌系或馬鈴薯上發現的第 2 生化型菌系。結果顯示，該分離株為台灣新出現菌系，與以往的青枯病菌具有不同的生化特性。

演化型測定

將分離純化所得之 3 株分離株抽取核酸後，進行青枯病菌專一性引子及演化型測定。由 multiplex PCR 結果顯示，從宜蘭罹病番茄所分離出之分離株 TBW01、TBW02 及 TBW03，均可增幅出第 2 演化型 372 bp 及青枯病菌 280 bp 之 DNA 特異性片段。第 1 演化型對照組之番茄青枯病菌分離株編號 105137，增幅出第 1 演化型之 144 bp 與青枯病菌之 280 bp 特異性 DNA 片段。而第 2 演化型對照組之馬鈴薯分離株編號 RS1118，增幅出第 2 演化型之 372 bp 及青枯病菌之 280 bp 特異性 DNA 片段，證實從宜蘭番茄罹病株分離所得的分離株屬於第 2 演化型青枯病菌 (圖 2)。

青枯病菌為表現型與基因型具有高度歧異度之複合種，Fegan & Prior (2005) 提出青枯病菌演化型的分類系統，利用 16S–23S rRNA gene intergenic spacer region (ITS) 的核酸序列，設計出 5 條引子，可將青枯病菌菌系區分為 4 個演化型。配合青枯病菌專一性引子 Au759f/Au760r 進行 multiplex PCR，可同時鑑定所分離的菌株是否為青枯病菌 (Fegan &

表 2.　番茄青枯病原細菌之生理生化分析。

Table 2.　Physiological and biochemical analyses of tomato bacterial wilt pathogen.

Character	TBW01, TBW02 and TBW03 strains	*Ralstonia solanacearum*[z]
Gram reaction	G (–)[y]	G (–)
O/F[y] test	O	O
Fluorescent pigment on KB	–	–
Colonies yellow or orange on YDC	–	–
Oxidase	+	+
Urease	+	+
Catalase	+	+
Arginine dihydrolase	–	–
Phenylalnine deaminase	–	–
Hydrolysis of gelatin	–	–
Nitrate reduction	+	+
Levan production	–	–
Hydrolysis of starch	–	–
Production of H_2S	–	–
Production of indole	–	–
Growth at 40	–	–
Growth in broth with 1.0% NaCl	+	+
Growth in broth with 1.5% NaCl	+	+
Growth in broth with 2.0% NaCl	–	–

[z] Data adapted from Huang *et al*. (2000) and Schaad *et al*. (2001).
[y] G (–): gram negative; O: oxidative; F: fermentation; +: postive ; and –: negative.

表 3.　番茄青枯病菌生化型測定。

Table 3.　Biovar test of *Ralstonia solanacearum* of tomato plants.

Carbohydrate	TBW01, TBW02 and TBW03 strains	*R. solanacearum* biovar 1[z]
Utilization of		
Mannitol	–[y]	–
Sorbitol	–	–
Dulcitol	–	–
Trehalose	+	+
Oxidation of		
Lactose	–	–
Maltose	–	–
Cellobiose	–	–

[z] Data adapted from Hayward (1994).
[y] +: positive; and –: negative.

Prior 2005)。此青枯病菌的 4 個演化型菌系與其地理位置起源相關，第 1 演化型，主要為亞洲 (Asia) 菌株，multiplex PCR 可增幅出第 1 演化型之 144 bp 特異性 DNA 片段以及青枯

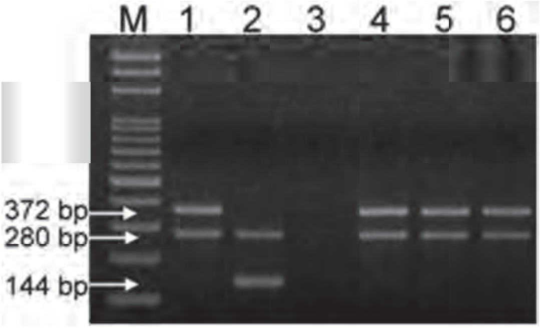


圖 2.　番茄青枯病菌演化型鑑定。行 M：100-bp marker；行 1：第 2 演化型青枯病菌分離株編號 RS1118 之 DNA 對照；行 2：第 1 演化型青枯病菌分離株編號 105137 之 DNA 對照；行 3：未含有 DNA 模板之負對照；行 4–6：分離自宜蘭番茄的青枯病菌分離株 TBW01、TBW02、TBW03。

Fig. 2.　Phylotype identification of *Ralstonia solanacearum*. Lane M: 100-bp marker; Lane 1: DNA control of *R. solanacearum* phylotype II isolate RS1118; Lane 2: DNA control of *R. solanacearum* phylotype I isolate 105137; Lane 3: no template control; and Lane 4–6: DNA of tomato bacterial wilt pathogen TBW01, TWB02 and TBW03 isolates.

病菌之特異性 DNA 片段 280 bp，第 2 演化型主要為美洲 (America) 菌株，可增幅出 372 bp 與 280 bp 之特異性片段。第 3 演化型 (phylotpye III) 主要為非洲及其周圍島嶼 (Africa and surrounding islands) 菌株，可增幅出 91 bp 與 280 bp 之特異性片段。第 4 演化型 (phylotype IV) 主要為印尼 (Indonesia) 菌株，可增幅出 213 bp 與 280 bp 之特異性片段。台灣田間存在第 1 演化型與第 2 演化型青枯病菌；第 1 演化型青枯病菌為田間最常見之菌系，目前均屬於第 1 生理小種，可感染多種寄主；第 2 演化型青枯病菌僅在馬鈴薯青枯病株上發現，屬於第 3 生理小種，尚無感染其他作物的紀錄。本次所分離所得的菌株，屬於第 2 演化型青枯病菌，首次發現感染田間番茄。

序列變種測定

為瞭解本次新發生的青枯病菌序列變種，以 *egl* 基因之專一性引子對 Endo-F/Endo-R 對上述 3 株青枯病菌分離株進行 PCR，可增幅出約 850 bp DNA 片段。該片段經基因選殖及定序所得之序列，3 株分離株比對彼此 DNA 序列相同度為 100%。因此，以 TBW01 為代表上傳 NCBI (GenBank accession number MT497919)，在 NCBI 資料庫中以 BLASTn 比對分析，發現 TBW01 分離株與 *R. solanacearum* strain AW1 (GenBank KC188082.1)，在可比對的區域中，相似度達 99% 以上。進一步將分離株 TBW01 之 *egl* 部分序列與國際上已發表的不同序列變種菌株進行親緣關係分析，在親緣關係分析結果顯示 TBW01 分離株屬於第 2 演化型中的 A 群 (phylotype IIA)，並與 IIA 中第 7 序列變種之青枯病菌參考菌株 *R. solanacearum* strain P822、ICMP7963、K60 及 AW1 歸類在一起 (圖 3)。因此，將本次所分離之青枯病菌分離株，鑑定為第 7 序列變種。

Fegan & Prior (2005) 提出青枯病菌演化

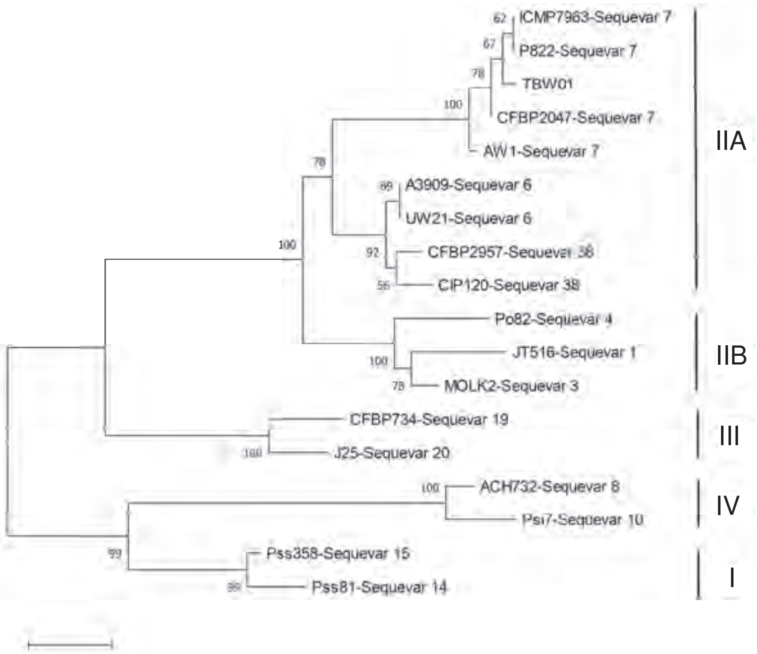


圖 3. 番茄青枯病菌 TBW01 分離株與參考菌株之部分內切葡聚糖酶基因序列，經鄰近結合法建立親緣樹狀圖，枝條處的數字代表 bootstrap 值。各菌株之 *egl*-tree 演化型 (I, IIA, IIB, III, IV) 標示在樹狀圖右側。比例尺表示每 100 個核苷酸有 1 個核苷酸變化。

Fig. 3. A neighbor-joining phylogenetic tree of tomato bacterial wilt TBW01 isolate and reference strains based on the partial endoglucanase gene sequences. The numbers on the branches represent bootstrap values. The endoglucanase (*egl*)-tree phylotypes (I, IIA, IIB, III and IV) of each strain are marked on the right side of the tree. The scale bar indicates 1 nucleotide change per 100 nucleotides.

型的分類系統，每個演化型均包含多個序列變種。一個序列變種，是指在特定基因範圍內具有高度保守性的一群青枯病菌菌株。在序列變種分析上，可利用青枯病菌之 *egl* 部分基因序列進行親緣關係分析。目前全球青枯病菌序列變種已達 64 個 (Chen 2018)，台灣的青枯病菌序列變種至少有 11 個 (10 個序列變種屬於第 1 演化型，1 個序列變種屬於第 2 演化型 B 群) (Lin *et al*. 2014)，仍不斷的在增加中。本次宜蘭地區發生的番茄青枯病菌，經親緣分析為第 7 序列變種且屬於第 2 演化型 A 群，為台灣新發生之序列變種菌株。第 7 序列變種青枯病菌在全球已被記載出現在非洲肯亞 (Kenya)、美國東南各州包括阿拉巴馬州 (Alabama)、路易斯安納州 (Louisiana)、佛羅里達州 (Florida)、喬治亞州 (Georgia)、北卡羅萊納州 (North Carolina)、南卡羅萊納州 (South Carolina) (Hong *et al*. 2012; Norman *et al*. 2018; Jimenez Madrid *et al*. 2019) 以及千里達島 (Trinidad) (Ramsubhag *et al*. 2012) 等地，可感染番茄、馬鈴薯、菸草、藍莓等作物。

圖 4. 番茄植株人工接種分離到的細菌，7 d 後植株萎凋 (左)，接種無菌水之對照植株 (右) 無病徵。

Fig. 4. The tomato plants showed wilt symptoms in 7 days after inoculation with the isolated bacteria (left) and no symptom in plants inoculated with sterile water (right).

科霍氏法則試驗

將上述 3 株分離株，以穿刺接種法接種至紅番番茄後，在接種 2 d 後，所接種之番茄植株開始出現葉片下垂的失水病徵，7 d 之後植株逐漸萎凋，植株維管束褐化，植株仍呈青綠色 (圖 4)，與田間所見的番茄病株病徵相同。接種無菌水的對照組番茄植株，則無出現萎凋的病徵。從發病的番茄莖部可再回分出病菌，該病菌再以上述 multiplex PCR 確認為與原接種病菌相同之第 2 演化型青枯病菌，完成科霍氏法則，確認該分離株為病原菌。

結論

作物青枯病在台灣田間發生已久，從過去的紀錄絕大多數的青枯病菌屬於第 1 生理小種/第 3 或 4 生化型/第 1 演化型，僅在馬鈴薯上發現第 3 生理小種/第 2 生化型/第 2 演化型青枯病菌。2016–2017 年在宜蘭縣 1 處番茄栽培田區所發生的番茄萎凋現象，檢測發現罹病株疑似有第 2 演化型青枯病菌感染，因此從病組織分離病原細菌。依據該細菌在 TTC 培養基的菌落型態特徵，Biolog 鑑定、16S rDNA 序列比對以及青枯病菌專一性引子對測定，鑑定病原細菌為 *R. solanacearum*。該分離株經測試寄主範圍將其歸類為第 1 生理小種，測試生化特性屬於第 1 生化型，經核酸序列分析為第 2 演化型以及第 7 序列變種。該分離株寄主範圍廣泛的特性，與台灣常見第 1 生理小種菌系相同，但該分離株屬於第 1 生化型/第 2 演化型特性，又與台灣田間常見的第 1 生理小種屬於第 3 或 4 生化型/第 1 演化型特性不同，該分離株亦與在馬鈴薯上發現之第 3 生理小種/第 2 生化型/第 2 演化型菌株不同。此外，該分離株屬於第 7 序列變種，亦未在台灣報導過，顯示該分離株為台灣新發生的青枯病菌系，此為第 1 生理小種/第 1 生化型/第 2 演化型/第 7 序列變種青枯病菌感染台灣田間番茄的首次報告。

誌謝

本研究承美國農業部柑橘及其他亞熱帶產品研究 Jason C. Hong 博士，對青枯病菌序列變種分析提供協助，特此申謝。

引用文獻

Buddenhagen, I., L. Sequeira, and A. Kelman. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52:726.

Chen, Y. 2018. The phylotype and sequevar of *Ralstonia solanacearum* and characteristics of bacterial wilt pathogen isolated from cucurbitaceae plants in Guangxi. Master Thesis, Department of Plant Pathology, Guangxi University, Guangxi, China. 63 pp. (in Chinese with English abstract)

Denny, T. P. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia species*. p.573–644. *in*: Plant-Associated Bacteria. (Gnanamanickam, S. S., ed.) Springer. Dordrecht, The Netherlands. 712 pp. doi:10.1007/978-1-4020-4538-7

Fegan, M., M. Taghavi, L. I. Sly, and A. C. Hayward. 1998. Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. p.19–33. *in*: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. (Prior, P., C. Allen, and J. Elphinstone, eds.) Springer Publishing. Berlin, Germany. 447 pp.

Fegan, M. and P. Prior. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. p.449–461. *in*: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. (Allen, C., P. Prior, and A. C. Hayward, eds.) APS Press. St. Paul, MN. 510 pp.

Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol. 27:265–277. doi:10.1111/j.1365-2672.1964.tb04912.x

Hayward, A. C. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. p.123–135. *in*: Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. (Hayward, A. C. and G. L. Hartman, eds.) CAB International. Wallingford, UK. 259 pp.

He, L. Y., L. Sequeira, and A. Kelman. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Dis. 67:1357–1361. doi:10.1094/PD-67-1357

Hong, J. C., D. J. Norman, D. L. Reed, M. T. Momol, and J. B. Jones. 2012. Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the southeastern United States. Phytopathology 102:924–936. doi:10.1094/PHYTO-12-11-0342

Hsu, S. T. 1991. Ecology and control of *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. Plant Prot. Bull. 33:72–79. (in Chinese with English abstract)

Huang, J. C., S. H. Hseu, and B. K. Sen. 2000. Bacterial wilt of jute caused by *Ralstonia solanacearum*. Plant Pathol. Bull. 9:35–38. (in Chinese with English abstract) doi:10.6649/PPB.200003_9(1).0006

Jimenez Madrid, A. M., V. P. Doyle, and M. L. Lewis Ivey. 2019. Characterization of *Ralstonia solanacearum* species complex strains causing bacterial wilt of tomato in Louisiana, USA. Can. J. Plant Pathol. 41:329–338. doi:10.1080/07060661.2019.1584588

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693–695.

Lin, C. H. 2008. Application of population profiling and detection of *Ralstonia solanacearum* on integrated management of tomato bacterial wilt. Doctoral Dissertation, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 101 pp.

Lin, C. H., K. C. Tsai, P. Prior, and J. F. Wang. 2014. Phylogenetic relationships and population structure of *Ralstonia solanacearum* isolated from diverse origins in Taiwan. Plant Pathol. 63:1395–1403. doi:10.1111/ppa.12209

Lipson, D. A. and S. K. Schmidt. 2004. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains. Appl. Environ. Microbiol. 70:2867–2879. doi:10.1128/AEM.70.5.2867–2879.2004

Norman, D. J., A. M. Bocsanczy, P. Harmon, C. L. Harmon, and A. Khan. 2018. First report of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* on blueberries (*Vaccinium corymbosum*) in Florida. Plant Dis. 102:438. doi:10.1094/PDIS-06-17-0889-PDN

Opina, N., F. Tavner, G. Hollway, J. F. Wang, T. H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. C. Hayward, V. Krishnapillai, W. F. Hong, B. W. Holloway, and J. N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5:19–30.

Peeters, N., A. Guidot, F. Vailleau, and M. Valls. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. Mol. Plant Pathol. 14:651–662. doi:10.1111/mpp.12038

Ramsubhag, A., D. Lawrence, D. Cassie, R. Fraser, P. Umaharan, P. Prior, and E. Wicker. 2012. Wide genetic diversity of *Ralstonia solanacearum*

strains affecting tomato in Trinidad, West Indies. Plant Pathol. 61:844–857. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02572.x

Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 373 pp.

Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plants samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21:4153–4154. doi:10.1093/nar/21.17.4153

Wu, Y. F., C. H. Lin, J. F. Wang, and A. S. Cheng. 2011. Population density of *Ralstonia solanacearum* potato strain, phylotype II/race 3/biovar 2, and incidence of potato bacterial wilt in fields in Dounan, Yunlin County. Plant Pathol. Bull. 20:68–77. (in Chinese with English abstract) doi:10.6649/PPB.201112_20(3_4).0002

Occurrence of *Ralstonia solanacearum* Race 1/Biovar 1/ Phylotype II/Sequevar 7 Causing Tomato Bacterial Wilt in Taiwan

Chia-Hsin Tsai[1,*], Shu-Ling Hwang[2], Jia-Rong Li[2], Ching-Yi Lin[3], and Yun-Sheng Lu[1]

Abstract

Tsai, C. H., S. L. Hwang, J. R. Li, C. Y. Lin, and Y. S. Lu. 2020. Occurrence of *Ralstonia solanacearum* race 1/biovar 1/phylotype II/sequevar 7 causing tomato bacterial wilt in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 69(4):274–285.

During 2016–2017, growth decline and wilt were observed in a number of tomato plants in a tomato planting field in Yilan County. The leaves of the wilt tomato plants remained greenish, similar to the symptoms of the bacterial wilt. The stems of the diseased tomato were cut open, and the vascular tissues were found browning in appearance. The bacteria colonies isolated from the diseased stems were fluidal, white with pink center on triphenyl tetrazolium chloride medium. Based on physiological and biochemical properties, Biolog identification system, 16S rDNA sequence analysis and specific primer pair, the bacteria were identified as *Ralstonia solanacearum*. The bacteria were further classified as race 1/biovar 1/phylotype II/sequevar 7 by the host range, biovar test, phylotype multiplex polymerase chain reaction and phylogenetic analysis. In Koch's postulates, the inoculated tomato plants developed wilt symptoms as those observed in the field, and the same bacteria were re-isolated from symptomatic plants. This is the first report of *R. solanacearum* race 1/biovar 1/phylotype II/sequevar 7 causing tomato bacterial wilt in Taiwan.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, Race 1, Biovar 1, Phylotype II, Sequevar 7.

Received: March 28, 2109; Accepted: July 1, 2020.
[*] Corresponding author, e-mail: tsaich@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Project Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(4):286–297 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202012_69(4).0003

研究報告

矽膠乾燥技術於蘭科植物種子超低溫保存上之應用研究

吳容儀 [1]　林景平 [2]　謝廷芳 [3]　莊耿彰 [4]　戴廷恩 [5]　張育森 [6,*]

摘要

吳容儀、林景平、謝廷芳、莊耿彰、戴廷恩、張育森。2020。矽膠乾燥技術於蘭科植物種子超低溫保存上之應用研究。台灣農業研究 69(4):286–297。

矽膠乾燥法 (silica gel desiccation) 已成功應用於台灣白及 (*Bletilla formosana*) 種子超低溫保存 (cryopreservation)，本研究持續探討經 24 h 乾燥的種子配合不同超低溫保存期間對台灣白及與白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) 種子保存後活力之影響。經於液態氮 (liquid nitrogen; LN) 保存 48 mo 後，台灣白及種子仍能維持 87.7% 高發芽率，比新鮮種子更高；白花蝴蝶蘭種子於 LN 保存 15 mo 後，亦能維持 100.0% 高發芽率，且較新鮮種子發芽率 (74.6%) 顯著更高，後續小苗生長發育也正常。將乾燥法作為前處理，應用在紅花鶴頂蘭 (*Phaius tankervilleae*) 花粉、白花蝴蝶蘭、雅美萬代蘭 (*Vanda lamellata*) 及丹尼森萬代蘭 (*Vanda denisoniana*) 的種子超低溫保存。結果顯示，經過前處理再於 LN 保存之紅花鶴頂蘭花粉可維持高發芽率 (81.0%)，在種子保存方面，經過 24 h 乾燥處理再進行超低溫保存 24 h，保存後白花蝴蝶蘭、雅美萬代蘭、丹尼森種子發芽率分別為 88.0%、100.0% 及 100.0%。其中，雅美萬代蘭種子對水分逆境具有耐性，能夠忍受乾燥且能於低溫下保存不會失去活力，符合正貯型種子的特質。因此，矽膠乾燥法同樣適用於紅花鶴頂蘭花粉、白花蝴蝶蘭、雅美萬代蘭及丹尼森萬代蘭種子，可作為超低溫保存之前處理。

關鍵詞：蘭花、乾燥法、遺傳資源、長期保存。

前言

隨著全球環境的變遷，氣候日益惡化，許多珍貴值得開發的蘭花因自然環境與人為因素，其野生族群逐年驟減，致使蘭花種原收集難度遽增。因此，所保存的種原如何長期且有效的延續，越益顯得格外重要。蘭花種子或花粉常見以低溫冷藏、低相對濕度或者結合兩種方式之保存，短期內可維持活力，但超過一定的時間，活力便受到影響。例如，台灣白及 (*Bletilla formosana*) 與鶴頂蘭 (*Phaius tankervilleae*) 種子在低溫或低相對濕度環境保存 4 mo，可以維持高活力，但 6 mo 以後種子活力便受到影響 (Chang *et al*. 2006; Hirano *et al*. 2009)。業界常使用的保存方式，如溫網室植株保存或花粉種子於冰箱低溫環境之保存，這幾種方式多屬於短期保存，保存期間也容易因栽培或環境因素產生生理或病蟲害等問題，最終將面臨種原流失的結果 (Wu *et al*. 2016)。因此，就蘭花產業永續發展而言，發展蘭花遺傳資源長期保存的方式非常重要。超低溫保存 (cryopreservation) 技術應用在種原之長期保存方面已行之有年，為目前國際公認可作為長期保存技術之一。保存前之前處理技術與超低溫保存能否成功有密切相關 (Ishikawa *et al*. 1997; Thammasiri 2000; Hirano *et al*.

投稿日期：2020 年 5 月 29 日；接受日期：2020 年 9 月 16 日。
* 通訊作者：yschang@ntu.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所花卉研究中心副研究員兼系主任。台灣 雲林縣。
[2] 農委會農業試驗所花卉研究中心計畫助理。台灣 雲林縣。
[3] 農委會農業試驗所植病組研究員兼組長。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所花卉研究中心研究員兼系主任。台灣 雲林縣。
[5] 農委會農業試驗所花卉研究中心研究員兼中心主任。台灣 雲林縣。
[6] 國立台灣大學園藝暨景觀學系教授。台灣 台北市。

2006; Gonzalez-Arnao *et al*. 2008)，許多蘭花種子於液態氮 (liquid nitrogen; LN) 保存前之前處理方式已經建立 (Ishikawa *et al*. 1997; Thammasiri 2000; Hirano *et al*. 2005a, 2005b; Hsiang *et al*. 2011; Popova *et al*. 2016)。種子前處理結束後，於 LN 中的保存時間，理論上當植物組織或器官置入超低溫 -196℃ LN 環境中保存，在此極度低溫下幾乎所有細胞生理代謝活動幾已停止，但是仍能維持生命活力，不易發生退化或體細胞變異的現象，因此推測可以長期有效地保存植物組織 (Na & Kondo 1996; Engelmann 2000; Matsumoto *et al*. 2001; Gonzalez-Arnao *et al*. 2008; Hirano *et al*. 2009)。多數研究報告僅以短時間之 LN 保存視同具有長期保存之效果，例如：10–30 min、1 h、1 d、1 wk、1–3 mo 或 1 yr (Thammasiri 2000; Wood *et al*. 2000; Nikishina *et al*. 2007; Hay *et al*. 2010; Hirano *et al*. 2011; Galdiano *et al*. 2012; Hu *et al*. 2013)，事實上有關植物組織實際在 LN 中經多年長期保存後之活力變化鮮有相關研究 (Hirano *et al*. 2009; Hu *et al*. 2013)。作者前已建立實用的台灣白及種子超低溫保存流程 (Wu *et al*. 2013; Wu *et al*. 2018)，本研究則進一步將此技術應用至其他蘭科植物遺傳資源之長期保存。保存物種的考量，以具有觀賞性或其他特用價值、經濟價值者為主要保存對象，並觀測不同超低溫保存時間對台灣白及與蝴蝶蘭種子後續活力等之影響，冀望研究成果能實際應用在產業，帶來經濟效益。

本研究選定紅花鶴頂蘭(*P. tankervilleae*)、白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*)、丹尼森萬代蘭 (*Vanda denisoniana*) 及雅美萬代蘭 (*Vanda lamellata*) 的種子或花粉為保存對象，將矽膠乾燥法應用於以上蘭花之遺傳資源，並期待後續能擴大應用在其他蘭科植物上，建立蘭花遺傳資源超低溫長期保存之資料庫平台，有助於種原長期保存。

材料與方法

超低溫保存時間對台灣白及與白花蝴蝶蘭種子保存後活力之影響

本試驗以種子為試驗材料，分別於台灣白及授粉後 90 d、白花蝴蝶蘭授粉後 189 d 時，將果莢取下，以 1% 次氯酸鈉 (sodium hypochlorite; NaOCl) 溶液消毒 10 min，再以無菌水沖洗果莢表面 3 次。取出種子充分混合後分裝成小包，每小包重量 50 mg，每包為 1 重複，每處理為 3 重複。先將整包種子放入裝有 15 g 矽膠粒 (silica gel) 的 20 mL 玻璃固定瓶進行乾燥，在實驗室環境下 (27℃ ± 1℃) 進行乾燥 24 h。乾燥結束後，再將種子取出置入冷凍管 (cryotube vial) 內，然後放入 LN 保存，於保存後第 1、6、12、18、24、27、30、33、36、48 個月將再將冷凍管取出，以 40℃水浴、1 min 回溫處理。將種子進行無菌播種，接著調查發芽率。

白花蝴蝶蘭試驗用種子，以秤藥紙分裝成不同小包裝，每小包重量 50 mg，每包為 1 重複，每處理 5 重複。保存前的預處理方式與台灣白及相同，於 LN 中保存 3、6、15 mo 後，將冷凍管取出經上述回溫處理，予無菌播種後，進行發芽率調查。以直徑 6 cm 的塑膠培養皿為播種容器，播種培養基為經 121℃高溫、1.05 kg cm^{-2} 高壓滅菌 20 min 之 1/2 MS 培養基 (Murashige & Skoog 1962)，並含有 2% 蔗糖、7% 洋菜、0.1% 活性碳，pH 調整為 6.0。播種後置於恆溫 25℃ ± 1℃、光強度 38 μmol m^{-2} s^{-1} 及 14 h 光週期環境中培養。經播種後 30 d，以解剖顯微鏡觀察並記錄種子發芽數，每個重複樣品計算 200 個種子。

台灣白及種子之活力檢測與掃描式電子顯微鏡觀察

台灣白及種子超低溫保存後活力之影響

取台灣白及自交後成熟度 60 d 的果莢，依照前述果莢消毒的方式處理，取出種子作為試驗材料。種子分裝成小包，每小包種子重量 50 mg，每包為 1 重複，每處理 3 重複。本試驗有 3 種處理方式：新鮮種子、新鮮種子直接置入 LN (-196℃) 中、新鮮種子以矽膠乾燥 24 h 後再置入 LN。矽膠乾燥處理者，先將整包種子放入裝有 15 g 矽膠粒的 20 mL 玻璃固定瓶保存，置於實驗室環境下 (25℃ ± 1℃) 24 h。後續經超低溫保存之處理，先將種子放入 1.8 mL

冷凍管，再置於 LN 保存 24 h 後。將冷凍管取出，以 40℃水浴、1 min 回溫處理後，以 triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色法檢測種子之活力率。新鮮種子與經 LN 保存 24 h 回溫後的種子，以 2, 3, 5-TTC 染色法進行活力檢測。以 1% TTC 進行染色處理，於 25℃處理 24 h 後，在解剖顯微鏡下觀察種子染色情形，胚具有紅色反應者即視為具有活力表現。每個重複樣品計算 200 個種子，據以估算種子活力百分率 (Hirano *et al*. 2005a; Hirano *et al*. 2005b; Hirano *et al*. 2009)。種子活力率 (%) = (胚呈現紅色種子數/有胚種子數) × 100%。

台灣白及種子之掃描式電子顯微鏡觀察

藥品試劑

1. 固定液 (2.5% glutaraldehyde in 0.1 M, PBS pH 7.3) 配製：取 25% glutaraldehyde 10 mL，加入 40 mL 的二次水 (distilled-deionized water; d. d. water)，再加 50 mL 0.2 M，PBS pH 7.3，即為固定液。固定液最好當天新鮮配製，試驗中所用到的磷酸緩衝液可於前一天先行配製，並置於 4℃中冷藏。
2. 磷酸緩衝液 PBS (0.2 M, pH 7.3)，A: NaH_2PO_4、$12H_2O$ 71.6 g L^{-1} (0.2 M)，B: Na_2HPO_4、$2H_2O$ 31.2 g L^{-1} (0.2 M)， 取 A 77 mL + B 23 mL 即可。另外，可加 5–8% sucrose 維持固定液滲透壓。
3. 1% Osmium tetroxide 配製：取 4% Osmium tetroxide 10 mL，加 10 mL 二次水，再加 20 mL 0.2 M，PBS pH 7.3，置於 4℃中冷藏。

方法

試驗參考 Wu (2013) 之方法修改進行，採集台灣白及授粉後 60 d 的果莢，經消毒後取出新鮮種子作為試驗材料。共 3 種處理：新鮮種子、新鮮種子直接置入 LN (-196℃) 中、新鮮種子以矽膠乾燥 24 h 後再置入 LN。矽膠乾燥處理者，先將整包種子放入裝有 15 g 矽膠粒的 20 mL 玻璃固定瓶保存，置於實驗室環境下 (25℃ ± 1℃) 24 h；後續經超低溫保存，先將種子放入冷凍管，再置於 LN 24 h 後，將冷凍管取出，以 40℃水浴、1 min 回溫處理。新鮮種子與其他二組經超低溫保存後回溫之種子，將之置於含 2.5% 戊二醛 (glutaraldehyde, Merck, Darmstadt, Germany) 之磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffer 0.1 M, pH 7.2) 中，於 4℃進行前固定 30 min，再於室溫下以 30× *g* 震盪過夜。以磷酸鹽緩衝液清洗 3 次後，置於含 1% 鋨酸 (osmium tetroxide, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) 之磷酸鹽緩衝液中，進行後固定 1 h，清洗 3 次後，分別以 35、35、50、60、70、85、90 及 95% 之乙醇依序浸泡 15 min，再以 100% 之絕對乙醇 (Merck) 浸泡 15 min 3 次。最後，進行二氧化碳臨界點乾燥 (critical point dryer, EM CPD300, Leica, Wetzlar, Germany)，再利用離子覆膜機 (ion sputter, SC502, Microscience Division, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) 鍍金。以掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, JSM-6510LV, JEOL, Peabody, MA, USA) 拍攝種子表面影像。

以矽膠乾燥方式進行蘭科植物遺傳資源超低溫保存

種子含水量分析

採取雅美萬代蘭自交後成熟度 300 d 的果莢，經消毒後取出種子作為材料，以秤藥紙分裝成不同小包裝，每小包重量 20 mg，每包為 1 重複，每處理 4 重複。再將種子放入裝有 15 g 矽膠粒的 20 mL 玻璃固定瓶進行乾燥，置於實驗室環境下 (25℃ ± 1℃)，並於採收後 0、2、4、6、24 h 分別以電子天平 (AG204, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) 秤重並記錄。再將種子置於 80℃烘箱乾燥至種子恆重為止，量秤種子乾重並記錄之。最後，依下列公式計算種子含水量。種子含水量 (%) = (種子鮮重 − 種子乾重)/種子鮮重 × 100%。

矽膠乾燥處理對其他蘭科植物遺傳資源超低溫保存後活力之影響

在紅花鶴頂蘭花朵盛花期取新鮮花粉塊，以 70% 酒精棉花擦拭表面消毒後，植入培養基。共有 3 種處理：新鮮花粉塊、新鮮花粉塊直接置入 LN 保存、新鮮花粉塊經矽膠乾燥 24 h 後再置入 LN 中保存。矽膠乾燥處理，在 LN 保存前，先將花粉塊放入裝有 15 g 矽膠粒的 20 mL 玻璃固定瓶進行乾燥，於實驗室環境下

(25℃ ± 1℃) 進行乾燥 24 h。經超低溫保存者，將花粉塊置入 1.8 mL 冷凍管中，再放進 LN 中保存 24 h (Hirano *et al*. 2009)。之後將冷凍管取出，以 40℃水浴、1 min 回溫處理後，進行活力檢測。每處理 4 重複，每重複 1 個花粉塊。

白花蝴蝶蘭、丹尼森萬代蘭及雅美萬代蘭則分別採自交後成熟度 189 d、260 d 及 239 d 的果莢，消毒後取出種子作為材料。種子經充分混合後，以秤藥紙分裝成不同小包裝，每小包重量 20 mg，每包為 1 重複，每處理 4 重複。本研究以新鮮種子作為對照組，共有 3 種處理：新鮮種子、新鮮種子直接置入 LN 保存、新鮮種子經矽膠乾燥 24 h 後再置入 LN 容器中保存。經矽膠乾燥之預處理，於 LN 保存前先將整包種子放入裝有 15 g 矽膠粒的 20 mL 玻璃固定瓶進行乾燥，於實驗室環境下 (25℃ ± 1℃) 進行乾燥 24 h。經超低溫保存者，將種子置入冷凍管中，放進 LN 24 h。之後將冷凍管取出，以 40℃水浴、1 min 回溫處理後，進行發芽率檢測。

活力檢測

花粉塊以 70% 酒精棉花擦拭表面消毒後，置於固體培養基，每培養皿植入 2 個花粉塊。自培養基中取出 4 朵不同花朵的花粉塊進行觀察。花粉塊取出後將其均勻壓散，於光學顯微鏡放大倍率 200× 下觀察花粉發芽情形。以花粉發芽率作為花粉活力調查，花粉管只要一突出花粉粒即視為已發芽，每重複逢機取 200 粒花粉進行調查。培養環境為 24℃ ± 1℃，完全黑暗。培養基採用 Brewbaker & Kwack (1963) 之基本培養基配方，成分為 2% 蔗糖、100 mg L^{-1} H_3BO_3、200 mg L^{-1} $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、300 mg L^{-1} $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$、100 mg L^{-1} KNO_3 及 1% agar，pH 為 5.5 ± 0.1 (Lee 1987; Hu 2001)。種子發芽率試驗，係將種子無菌播種於直徑 6 cm 的塑膠培養皿中，培養基成分與培養環境同前述方式。於播種後 30 d，以解剖顯微鏡觀察並記錄種子發芽數，每個重複樣品計算 200 個種子。發芽率 (%) = (胚突破種皮並已轉綠之種子數/有胚種子數) × 100%。調查各處理之種子發芽率，並持續進行各處理間之小苗後續形態觀察與拍照記錄。

統計分析

試驗設計採完全逢機設計 (complete randomized design; CRD)，以 Costat 6.4 統計軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 後，並以最小顯著差異分析 (least significant difference; LSD) 探討各處理間平均值之差異性。

結果與討論

超低溫保存時間對台灣白及與白花蝴蝶蘭種子保存後活力之影響

雖然許多超低溫保存相關研究報告已指出，當植物組織或器官於極低的溫度 -196℃ LN 環境中保存時，幾乎所有細胞生理代謝活動已停止，但仍能維持生命活力 (Na & Kondo 1996; Engelmann 2000; Matsumoto *et al*. 2001; Gonzalez-Arnao *et al*. 2008; Hirano *et al*. 2009)。然而，此為理論值，因為試驗年限久需長期觀察，有實際執行上之困難。因此，絕大多數研究僅將保存材料短暫時間 (10–30 min、1 h、1 d、1 wk、1–3 mo 或 1 yr 等) 存放於 LN 中，便將之視為長期保存之效果 (Thammasiri 2000; Wood *et al*. 2000; Nikishina *et al*. 2007; Hay *et al*. 2010; Hirano *et al*. 2011; Galdiano *et al*. 2012; Hu *et al*. 2013)，鮮見植物組織或器官實際在 LN 中保存多年之相關研究結果 (Marks *et al*. 2014)。本研究以台灣白及與白花蝴蝶蘭種子為保存材料，於保存前進行矽膠乾燥處理 24 h，經過不同的超低溫保存時間後，結果顯示新鮮採收之台灣白及種子發芽率為 60.3%，於 LN 中貯藏 6 mo 後發芽率為 70.6%，貯藏 1 yr 後之種子發芽率提升至 78.0%，在 6–27 mo 貯藏期間之種子發芽率略有波動，範圍在 70.0–79.0% 之間，而在 30 mo 以上發芽率則達 80.0% 以上。目前台灣白及種子已於 LN 中保存 48 mo (4 yr)，經回溫後種子發芽率為 87.7% (圖 1)。貯藏期間發芽率數值之變動，可能是因為種子個體間的差

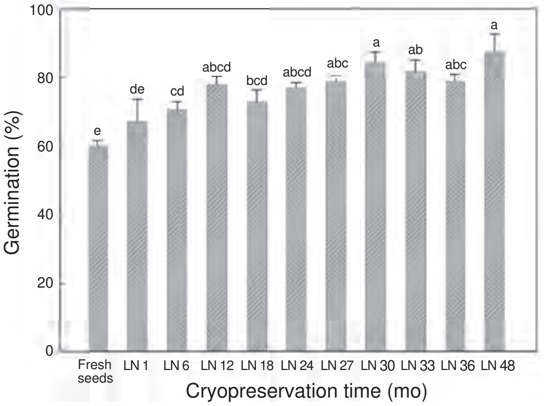


圖 1.　不同超低溫保存期間對台灣白及種子保存後發芽率之影響。

Fig. 1.　Effect of cryostorage duration on germination percentage of *Bletilla formosana* seeds after cryopreservation. Mean values with the same letter are not significant by least significant difference (LSD) test ($P \leq 0.05$).

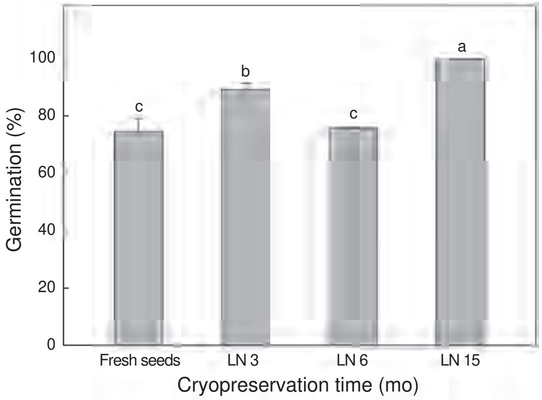


圖 2.　不同超低溫保存期間對白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) 種子保存後發芽率之影響。

Fig. 2.　Effect of cryostorage duration on germination percentage of *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* seeds after cryopreservation. Mean values with the same letter are not significant by least significant difference (LSD) test ($P \leq 0.05$).

異，或是每批種子播種時所遭遇環境不完全相同所致。但整體超低溫保存過程，呈現出種子發芽率有略為上升的趨勢，較新鮮採收種子來得高。此結果與 Hu *et al*. (2013) 進行台灣白及種子不同期間的超低溫保存結果有相同趨勢，其保存 1 yr 後的種子發芽率有增加的情形。

在白花蝴蝶蘭種子的長期保存方面，結果顯示新鮮種子發芽率為 74.6%，種子於 LN 中保存 3 mo 者發芽率提升至 89.2%，在第 6 個月時略有下降，目前已在 LN 中保存 15 mo，種子發芽率達 100.0% (圖 2)。整體而言，超低溫保存過程中，種子的發芽率並無減少的情形，反而有略為上升的趨勢，且較新鮮採收種子來得高。

其他物種的研究報告顯示，不同期間的超低溫保存並不會影響種子發芽率 (González-Benito *et al*. 1998a; González-Benito *et al*. 1998b; Pence 2003)。Hu *et al*. (2013) 以台灣白及種子為保存材料，以玻璃質化法配合超低溫保存，冷凍保存期間從 10 min 至 1 yr，經回溫後種子發芽率並無顯著變化。相較於其他貯藏方式，許多物種不會受到超低溫影響種子發芽 (Pence 1991; Touchell & Dixon 1993; González-Benito *et al*. 1998b)，但有些物種，則會因為超低溫而使發芽率受到改變 (Tikhonova 1999)。許多經 LN 保存過的種子，經回溫後，發芽率明顯高於未經 LN 保存者，超低溫保存可以增加蘭花種子的發芽率已經陸續被證實 (Nikishina *et al*. 2001a, 2001b; Popov *et al*. 2004; Nikishina *et al*. 2007; Hu *et al*. 2013)。在本研究所採用的台灣白及與白花蝴蝶蘭種子以矽膠乾燥法配合超低溫保存，所得到的結果，經過 LN 保存者，回溫後種子發芽率較未經 LN 保存者來得高，此結果與前人所研究之結論相同 (Nikishina *et al*. 2001a, 2001b; Popov *et al*. 2004; Nikishina *et al*. 2007; Hu *et al*. 2013)。再者，台灣白及與白花蝴蝶蘭的種子於 LN 中保存期間之延長，發芽率亦有增加之趨勢 (圖 1、圖 2)。LN 保存再回溫後經無菌播種，種子均可順利發芽正常生長，觀察小植株與未經 LN 保存者之外表型並無不同，此結果與前人所觀察種子經超低溫保存後，並不影響後續植株的發育有一致的結論 (Popov *et al*. 2004)。本研究結果可知，在進行台灣白及種子長期保存時，選用成熟度較高、授粉後 90 d 的種子，施以矽膠乾燥處理 24 h 後，於 LN 環境可以保存 48 mo 以

上，並能維持種子高發芽率 (87.7%)，後續小苗生長發育正常。相同的操作程序應用在白花蝴蝶蘭授粉後 189 d 的種子，同樣可使種子於超低溫保存 15 mo 以上，並能維持高發芽率 (100.0%)。

台灣白及種子之活力檢測與掃描式電子顯微鏡觀察

採收之新鮮種子經 24 h 矽膠乾燥後，置入 LN 中保存，以新鮮種子為對照組，於掃描式電子顯微鏡下觀察種皮表面變化。結果顯示，未經 LN 保存的新鮮種子種皮表面完整 (圖 3A)，直接將新鮮種子置入 LN 保存者，種子回溫後種皮表面受到嚴重的破壞 (圖 3B)，呈現不規則的裂痕。相較之下，經 24 h 矽膠乾燥處理與 LN 保存之未成熟種子，在種子回溫後於觀察到種皮表面有皺縮，少許破裂的情況 (圖 3C)。以 TTC 染色法進行種子活力檢測，觀察胚是否仍具有活力，圖 4 顯示新鮮種子的胚呈現紅色反應，表示胚具有良好活力 (圖 4A)。直接將新鮮種子置入 LN 保存者，回溫後種子的胚為無色反應 (圖 4B)，表示經保存後的胚已無活力，應是保存前未經矽膠乾燥處理致使胚受到貯藏期間冰晶之損害。經 24 h 矽膠乾燥處理者，回溫後種子以 TTC 染色結果，多數胚仍具有活力 (圖 4C)，顯示經矽膠乾燥 24 h 與超低溫保存 24 h 後的種子表面雖有些許受到破壞，但是多數胚並未受到傷害仍然具有活力。種子並未因 LN 造成傷害使發芽率降低，反而較新鮮種子的發芽率更高。試驗結果顯示，經過乾燥處理與 LN 保存後，造成種皮破裂但多數胚未受到傷害，推估因種皮的破損提供水分進入的管道 (Patanè & Bradford 1993)，而有利於回溫後種子之發芽。類似的情形也出現在其他物種，LN 會造成扣形苜蓿 (*Medicago orbicularis*) 的種皮破裂，進而提高發芽百分率及促進發芽速度，發芽率的提升乃種皮破裂加快了水合作用 (hydration) 所致 (Patanè & Gresta 2006)。蝴蝶蘭與蕓苔屬 (*Brassia*) 種子表皮也因 LN 造成種皮破裂之機械性傷害，可能促進吸收培養基中的溶質，同時刺激胚展開與改善發芽 (Mweetwa & Welbaum 2007)。

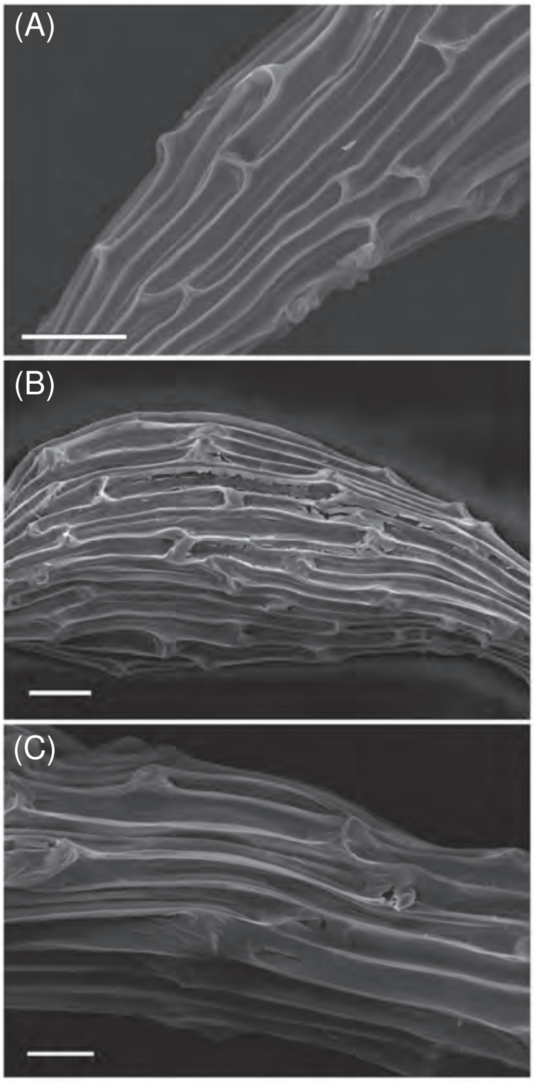


圖 3. 台灣白及授粉後 60 d 的種皮電子顯微鏡觀察 (A) 新鮮種子種皮外觀完整 (Bar = 50 μm)；(B) 新鮮種子直接置入液態氮保存，種子回溫後種皮表面受到嚴重的破壞，呈現不規則的裂痕 (Bar = 50 μm)；(C) 新鮮種子經過 24 h 乾燥，置入液態氮保存，種子回溫後之種皮有少許破損 (Bar = 20 μm)。

Fig. 3. Electron micrographs of testa of *Bletilla formosana* fresh seeds 60 days after pollination. (A) Complete testa of fresh seeds (Bar = 50 μm); (B) severe cracked testa of cryopreserved fresh seed (no 24 h desiccation) after thawing (Bar = 50 μm); and (C) broken testa of cryopreserved fresh seeds (24 h desiccation) after thawing (Bar = 20 μm).

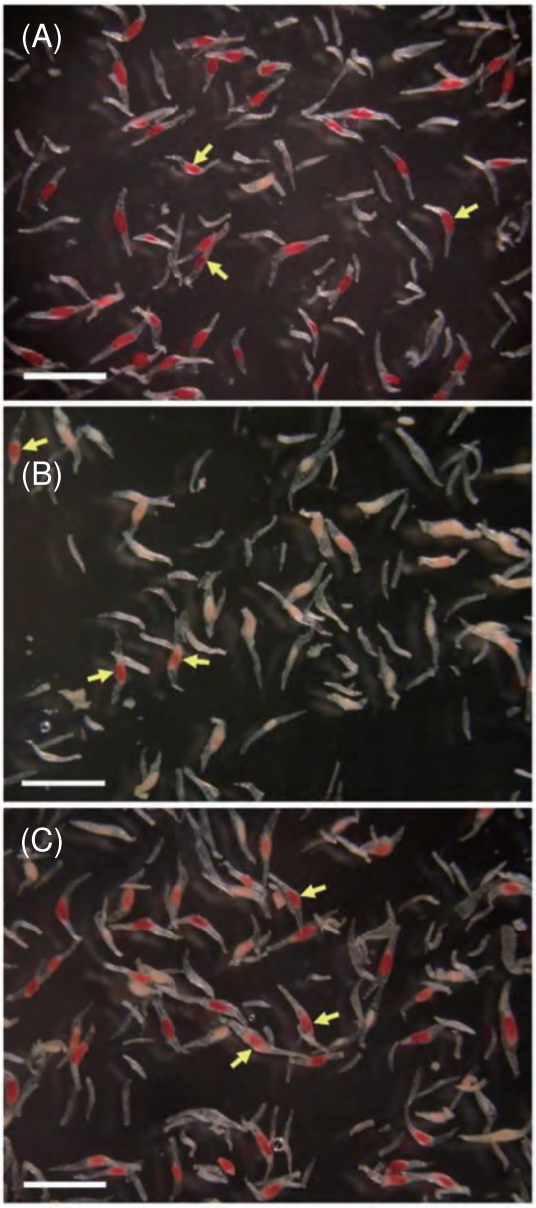


圖 4.　台灣白及授粉後 60 d 種子之 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 活力檢測 (A) 多數新鮮種子的胚具有活力；(B) 新鮮種子直接置入液態氮中保存，回溫後多數胚已無活力；(C) 新鮮種子經過 24 h 乾燥，置入液態氮保存，回溫後多數胚仍有活力。箭頭處：有活力種子 (Bar = 1 mm)。

Fig. 4.　2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) viability staining of *Bletilla formosana* seeds 60 days after pollination. (A) Fresh seeds; (B) cryopreserved directly fresh seeds after thawing; and (C) cryopreserved fresh seeds (24h desiccation) after thawing. Arrows: viable seeds. Bar = 1 mm.

以矽膠乾燥方式進行蘭科植物遺傳資源超低溫保存

前以乾燥法作為台灣白及種子長期保存之前處理，已成功地保存種子並可維持高活力 (Wu *et al*. 2013)，乃進一步將建立之流程應用於其他蘭科植物。本試驗以紅花鶴頂蘭花粉塊、白花蝴蝶蘭、雅美萬代蘭及丹尼森萬代蘭種子為材料進行保存，結果顯示紅花鶴頂蘭新鮮花粉塊經過培養後的發芽率為 81.4%，花粉塊置入 LN 前未經任何前處理者，在保存後活力驟降至 25.4%，為所有處理中最低者。經矽膠乾燥 24 h 的花粉塊，再置入 LN 保存 24 h，回溫後花粉發芽率力可維持在 81.0% (表 1)。以成熟的雅美萬代蘭種子作為保存材料，新鮮種子含水量為 34.6% (圖 5)，經過 2 h 矽膠乾燥後，含水量急遽降低至 8.6%，乾燥 4 h 已達 5.7%。此時含水量變化已漸趨穩定，種子在乾燥 24 h 後的含水量為 4.2%。在種子發芽率方面，以成熟的白花蝴蝶蘭種子作為長期保存材料，對照組新鮮種子的發芽率為 77.5% (圖 6A)，在超低溫保存前未經任何乾燥處理者，保存後無菌播種 1.5 mo，種子完全不發芽。若保存前種子經 24 h 矽膠乾燥處理後再置入 LN 者，保存 24 h 後的種子發芽率為 88.0%。雅美萬代蘭新鮮採收種子的發芽率為 93.8%，在保存前未經任何乾燥處理者，於保存後的種

表 1.　乾燥處理對紅花鶴頂蘭 (*Phaius tankervilleae*) 花粉超低溫保存 24 h 後發芽之影響。

Table 1.　Effect of desiccation on pollen tube growth of *Phaius tankervilleae* pollens after cryopreservation.

Treatment	Pollen germination (%)[z]
Fresh pollen	81.4 a[y]
LN[x]	25.4 b
Dry + LN[w]	81.0 a

[z] Fresh pollens were cultured *in vitro* on BK (Brewbaker & Kwack 1963) medium. The germination percentage of pollens observed under microscope.
[y] Means within each column followed by the same letters indicate no significant difference at 5% level by least significant difference (LSD) test.
[x] Fresh pollens without drying treatment directly plunged into liquid nitrogen (LN, -196℃).
[w] Fresh pollens dried with silica gel for 24 h, then plunged into liquid nitrogen.

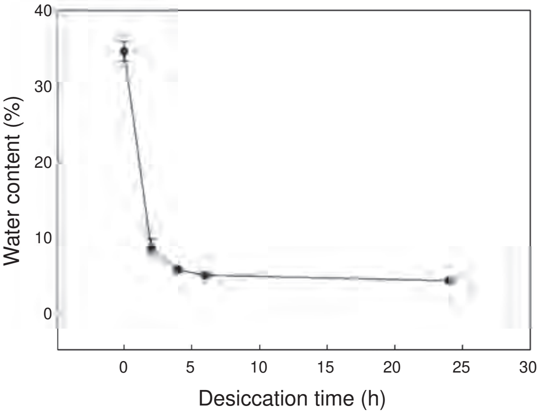


圖 5. 雅美萬代蘭種子於矽膠乾燥處理期間之含水量變化。

Fig. 5. Changes in water content of *Vanda lamellata* seeds during silica gel drying. Bars represent standard error of the mean and are not visible if smaller than the symbol.

子發芽率為 0.0%，保存材料經 24 h 矽膠乾燥處理後再置入 LN 保存 24 h 者，種子發芽率則為 100.0% (圖 6B)。以成熟的丹尼森萬代蘭種子作為保存材料，新鮮採收種子的發芽率為 100.0%，保存前未經任何乾燥處理者，於保存後的種子發芽率僅為 1.6%，保存前種子經 24 h 矽膠乾燥處理後再置入 LN 24 h 者，發芽率為 100.0% (圖 6C)。

Stanwood & Bass (1981) 曾提出，種子能成功地在極度低溫的 LN 中保存，含水量為關鍵點，過多的水分會造成冷凍保存期間組織中的游離水形成冰晶，因而對細胞造成傷害。雖然多數蘭花種子經過適當的脫水處理後再置入 LN 中保存，得以維持高活力 (Thammasiri 2000; Hirano *et al*. 2006; Wu *et al*. 2013; Popova *et al*. 2016)，但是少數蘭花種子對乾燥敏感。例如，當鶴頂蘭種子含水量降太低時 (2.0%)，會影響種子在 4℃與 25℃環境下的保存活力 (Hirano *et al*. 2009)。類似的情形也發生在嘉德麗雅蘭 (*Cattleya aurantiaca*)，當種子含水量低於 5.6% 時，對一定貯藏溫度下 (-18℃、5℃、20℃) 的種子不利其生存 (Seaton & Hailes 1989)。因此，乾燥的程度依種類不同而異。雅美萬代蘭的含水量試驗中，新鮮種子之含水量為 34.6% (圖 5)，經過 24 h 的

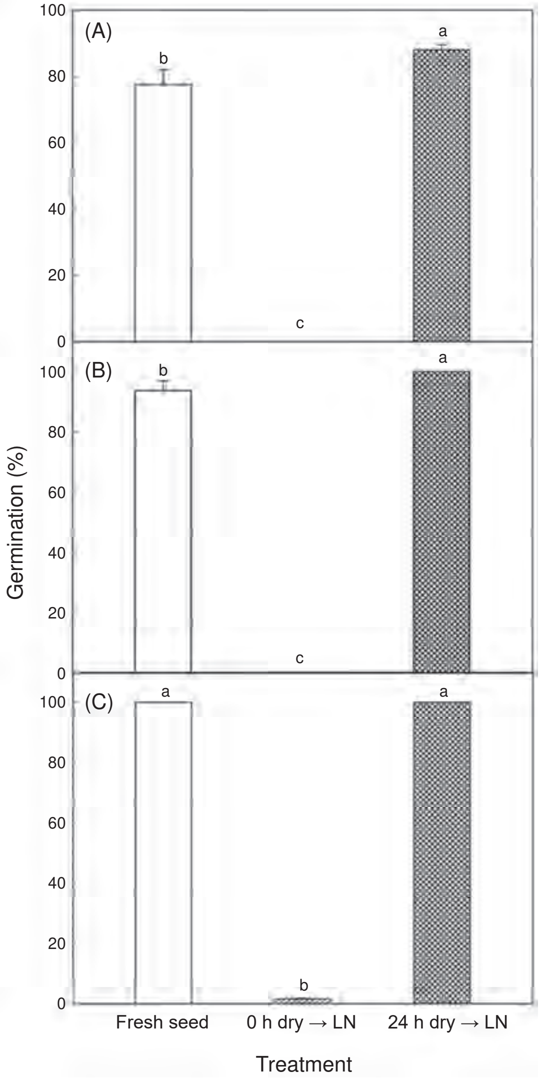


圖 6. 乾燥處理及超低溫保存對 (A) 白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*)；(B) 雅美萬代蘭；(C) 丹尼森萬代蘭種子發芽之影響。

Fig. 6. Effect of silica gel desiccation and cryopreservation on germination of (A) *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*; (B) *Vanda lamellata*; and (C) *Vanda denisoniana* seeds after thawing. Mean values with the same letter are not significant by least significant difference (LSD) test ($P \leq 0.05$).

矽膠乾燥後已趨穩定，含水量降低至 4.2%。然而，在如此低的含水量，種子發芽率仍達 100.0% (圖 6)。此種對水分逆境具有耐性的特質，能夠忍受乾燥而且能長期保存，符合正貯型種子的特質 (orthodox seed)，能忍受乾燥

處理而且不會失去種子活力，可以進行長期保存 (Grout *et al*. 1983; Dickie *et al*. 1991)。這類型的物種，例如紫葉挪威楓 (Norway maple, *Acer platanoides* L.) 種子也是屬於正貯型種子，能在室溫下緩慢地乾燥直到種子含水量達 8.0–10.0%，而且不會失去活力 (Dickie *et al*. 1991)。油棕 (*Elaeis guineensis* L.) 種子果仁含水量為 21.0% 時，活力為 96.0%，而當果仁乾燥至含水量為 4.4% 時，仍未失去活力，亦屬正貯型種子 (Grout *et al*. 1983)。

由上述結果可知，多數蘭花遺傳資源在進行 LN 長期保存前，保存材料如果未經過預處理，在經過 -196℃超低溫保存後，花粉或種子的發芽率近乎 0.0%，此與前人研究所述一致。多數生物組織在接觸到如此低的溫度，且沒有任何針對含水量的前處理時，保存組織通常會因為細胞內的結凍現象而致死 (Stanwood & Bass 1981; Hirano *et al*. 2009)。必需經過一段時間的前處理流程，方能有效地保存材料並維持高活力 (Wang *et al*. 1998; Hirano *et al*. 2009)，而保存後的活力因蘭花種類不同而有程度上的差異 (Sakai 2000; Hirano *et al*. 2006)。

誌謝

本研究承李哖教授、陳福旗院長、黃光亮院長、張正博士、張祖亮博士悉心協助論文審閱與斧正，特此致謝。

引用文獻

Brewbaker, J. L. and B. H. Kwack. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Amer. J. Bot. 50:859–865. doi:10.1002/j.1537-2197.1963.tb06564.x

Chang, C., P. G. Sung, C. H. Chang, Y. C. Chen, and Y. H. Lin. 2006. Seed development and storage of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. Seed Nursery (Taiwan) 8:29–38. (in Chinese with English abstract)

Dickie, J. B., K. May, S. V. A. Morris, and S. E. Titley. 1991. The effect of desiccation on seed survival in *Acer platanoides* L. and *Acer pseudoplatanus* L. Seed Sci. Res. 1:149–162. doi:10.1017/S0960258500000829

Engelmann, F. 2000. Importance of crop for conservation of plant genetic resources. p.8–20. *in*: Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. (Engelmann, F. and H. Takagi, eds.) International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. 496 pp.

Galdiano, Jr., R. F., E. G. M. Lemos, R. T. Faria, and W. A. Vendrame. 2012. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. Sci. Hortic. 148:154–160. doi:10.1016/j.scienta.2012.09.036

Gonzalez-Arnao, M. T., A. Panta, W. M. Roca, R. H. Escobar, and F. Engelmann. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. Plant Cell Tissue Organ. Cult. 92:1–13. doi:10.1007/s11240-007-9303-7

González-Benito, M. E., F. Fernández-Llorente, and F. Pérez-García. 1998a. Interaction between cryopreservation, rewarming rate and seed humidification on the germination of two Spanish endemic species. Ann. Bot. 82:683–686. doi:10.1006/anbo.1998.0711

González-Benito, M. E., J. M. Iriondo, and F. Pérez-Garíca. 1998b. Seed cryopreservation: An alternative method for the conservation of Spanish endemics. Seed Sci. Technol. 26:257–262.

Grout, B. W. W., K. Shelton, and H. W. Pritchard. 1983. Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. Ann. Bot. 52:381–384. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a086586

Hay, F. R., D. J. Merritt, J. A. Soanes, and K. W. Dixon. 2010. Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. Bot. J. Linn. Soc. 164:26–41. doi:10.1111/j.1095-8339.2010.01070.x

Hirano, T., T. Godo, M. Mii, and K. Ishikawa. 2005a. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. Plant Cell Rep. 23:534–539. doi:10.1007/s00299-004-0893-9

Hirano, T., K. Ishikawa, and M. Mii. 2005b. Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis Graminifolia* var. *Suzukiana* by vitrification. CryoLetters 26:139–146.

Hirano, T., K. Ishikawa, and M. Mii. 2006. Advances in orchid cryopreservation. Floric. Ornam. Plant Biotechnol. 2:410–414.

Hirano, T., T. Godo, K. Miyoshi, K. Ishikawa, M. Ishikawa, and M. Mii. 2009. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. Plant Biotechnol. Rep. 3:103–109. doi:10.1007/s11816-008-0080-5

Hirano, T., T. Yukawa, K. Miyoshi, and M. Mii. 2011. Wide applicability of cryopreservation with vitrifi-

cation method for seeds of some *Cymbidium* species. Plant Biotechnol. (Tokyo) 28:99. doi:10.5511/plantbiotechnology.10.1115a

Hsiang, E. H., W. T. Tsai, T. F. Hsieh, T. Matsumoto, and T. Niino. 2011. Effects of drying treatment and cryopreservation on seed viability of *Phalaenopsis amabilis* and *Phalaenopsis aphrodite*. J. Taiwan Agric. Res. 60:309–317. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2011.06004.07

Hu, J. R. 2001. Pollen development, pollen viability, fruit set, and seed germination *in vitro* of *Oncidium* and Allied genera. Master Thesis, Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 112 pp. (in Chinese with English abstract)

Hu, W. H., Y. H. Yang, S. I. Liaw, and C. Chang. 2013. Cryopreservation the seeds of a Taiwanese terrestrial orchid, *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. by vitrification. Bot. Stud. 54:33. doi:10.1186/1999-3110-54-33

Ishikawa, K., K. Harata, M. Mii, A. Sakai, K. Yoshimatsu, and K. Shimomura. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. Plant Cell Rep. 16:754–757. doi:10.1007/s002990050314

Lee, C. L. 1987. Studies on pollen viability and preservation of horticultural crops. Sci. Agric. 35:347–356. (in Chinese with English abstract)

Marks, T. R., P. T. Seaton, and H. W. Pritchard. 2014. Desiccation tolerance, longevity and seed-siring ability of entomophilous pollen from UK native orchid species. Ann. Bot. 114:561–569. doi:10.1093/aob/mcu139

Matsumoto, T., K. Mochida, H. Itamura, and A. Sakai. 2001. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. Plant Cell Rep. 20:398–402. doi:10.1007/s002990100350

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Mweetwa, A. M. and G. E. Welbaum. 2007. Orchid seed storage for germplasm preservation. Acta Hortic. 760:629–636. doi:10.17660/ActaHortic.2007.760.89

Na, H. Y. and K. Kondo. 1996. Cryopreservation of tissue-cultured shoot primordia from shoot apices of cultured protocorms in *Vanda pumila* following ABA preculture and desiccation. Plant Sci. 118:195–201. doi:10.1016/0168-9452(96)04438-X

Nikishina, T. V., A. S. Popov, G. L. Kolomeitseva, and B. N. Golovkin. 2001a. Cryopreservation of seeds of some tropical orchids. Dokl. Biochem. Biophys. 378:231–233. doi:10.1023/A:1011585801668

Nikishina, T. V., A. S. Popov, G. L. Kolomeitseva, and B. N. Golovkin. 2001b. Effect of cryoconservation on seed germination of rare tropical orchids. Russ. J. Plant Physiol. 48:810–815. doi:10.1023/A:1012520927743

Nikishina, T. V., E. V. Popova, M. G. Vakhrameeva, T. I. Varlygina, G. L. Kolomeitseva, A. V. Burov, E. A. Popovich, A. I. Shirokov, V. Y. Shumilov, and A. S. Popov. 2007. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. Russ. J. Plant Physiol. 54:121–127. doi:10.1134/S1021443707010189

Patanè, C. and K. J. Bradford. 1993. Seed dormancy in two *Medicago* species typical of natural pastures of Ragusa plateau. Riv. di Agron. 27:412–418.

Patanè, C. and F. Gresta. 2006. Germination of *Astragalus hamosus* and *Medicago orbicularis* as affected by seed-coat dormancy breaking techniques. J. Arid Environ. 67:165–173. doi:10.1016/j.jaridenv.2006.02.001

Pence, V. C. 1991. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species. Seed Sci. Technol. 19:235–251.

Pence, V. 2003. *In vitro* growth of embryo axes after long-term storage in liquid nitrogen. p.483–492. *in*: Seed Conservation: Turning Science into Practice. (Smith, R. D., J. B. Dickie, S. H. Linington, H. W. Pritchard, and R. J. Probert, eds.) Royal Botanical Garden. Kew, London. 1023 pp.

Popov, A. S., E. V. Popova, T. V. Nikishina, and G. L. Kolomeytseva. 2004. The development of juvenile plants of the hybrid orchid *Bratonia* after seed cryopreservation. CryoLetters 25:205–212.

Popova, E., H. H. Kim, P. K. Saxena, F. Engelmann, and H. W. Pritchard. 2016. Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. Biotechnol. Adv. 34:380–403. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.01.001

Sakai, A. 2000. Development of cryopreservation techniques. p.1–7. *in*: Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. (Engelmann, F. and H. Takagi, eds.) Japan International Research Center for Agricultural Sciences. Tsukuba, Japan. 496 pp.

Seaton, P. T. and N. S. J. Hailes. 1989. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. p.17–30. *in*: Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management. (Pritchard, H. W., ed.) Cambridge University Press. Cambridge, UK. 184 pp.

Stanwood, P. C. and L. N. Bass. 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. Seed Sci. Tech-

nol. 9:423–437.

Thammasiri, K. 2000. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification. CryoLetters 21:237–244.

Tikhonova, V. L. 1999. Long-term storage of seeds. Russ. J. Plant Physiol. 46:400–408.

Touchell, D. H. and K. W. Dixon. 1993. Cryopreservation of seed of Western Australian native species. Biodivers. Conserv. 2:594–602. doi:10.1007/BF00051960

Wang, J. H., J. G. Ge, F. Liu, H. W. Bian, and C. N. Huang. 1998. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. Cryo Letters 19:123–128.

Wood, C. B., H. W. Pritchard, and A. P. Miller. 2000. Simultaneous preservation of orchid seed and its fungal symbiont using encapsulation-dehydration is dependent on moisture content and storage temperature. CryoLetters 21:125–136.

Wu, C. 2013. Effect of acid adaptation on the physiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* and its environmental stress tolerance. Master Thesis, Department of Animal Science and Technology, College of Bioresources and Agriculture, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 96 pp. (in Chinese with English abstract)

Wu, R. Y., S. Y. Chang, T. F. Hsieh, and Y. S. Chang. 2013. Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation. Sci. Hortic. 157:108–112. doi:10.1016/j.scienta.2013.03.033

Wu, R. Y., S. Y. Chang, T. F. Hsieh, K. C. Chuang, I. Ting, Y. H. Lai, and Y. S. Chang. 2016. Cryopreservation of orchid genetic resources by desiccation: A case study of *Bletilla formosana*. p.201–217. *in*: Cryopreservation in Eukaryotes. (Marco-Jiménez, F. and H. Akdemir, eds.) InTechOpen. Rijeka, Croatia. 228 pp. doi:10.5772/65302

Wu, R. Y., K. C. Chuang, T. F. Hsieh, and Y. S. Chang. 2018. Effect of capsule maturity and desiccation time on viability of Taiwan native orchid, *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) after cryopreservation. Taiwania 63:345–350. doi:10.6165/tai.2018.63.345

Study on Cryopreservation of Orchidaceae Seeds by Silica Gel Desiccation and Its Application

Rung-Yi Wu[1], Ching-Ping Lin[2], Ting-Fang Hsieh[3], Keng-Chang Chuang[4], Ting-En Dai[5], and Yu-Sen Chang[6,*]

Abstract

Wu, R. Y., C. P. Lin, T. F. Hsieh, K. C. Chuang, T. E. Dai, and Y. S. Chang. 2020. Study on cryopreservation of orchidaceae seeds by silica gel desiccation and its application. J. Taiwan Agric. Res. 69(4):286–297.

Desiccation method has been successfully applied for the cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae). This study investigated the effects of cryostorage duration on the viability of *B. formosana* and *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* seeds after cryopreservation. After 24 h desiccation by silica gel and cryopreservation for 48 mo, *B. formosana* seeds still remained high germination percentage (87.7%) and higher than fresh seeds. *Phal. aphrodite* subsp. *formosana* seeds could retained significant higher germination percentage (100.0%) than fresh seed treatment (74.6%) after cryopreservation for 15 mo. The plantlet from cryostoraged seeds could grow and develop well. The germination percentage of dried and cryopreserved seed for 24 h was higher than that of fresh seeds after cryopreservation. Under scanning electron microscopy, it is clear that immersing seeds in liquid nitrogen (LN) induces breakage in the seed coat, then cracks in the seed coat provide channels that facilitate hydration and may increase germination. The technique could be applied for the pretreatment prior to cryopreservation of *Phaius tankervilleae* polllen, *Phal. aphrodite* subsp. *formosana*, *Vanda lamellata* and *Vanda denisoniana* seeds. The results showed that the germination percentage of freshly harvested pollen of *P. tankervilleae* was 81.4%, pollens directly placed in LN was low (25.4%) after thawing. However, the germination percentage increased to 81.0% for seeds dried with silica gel for 24 h prior to cryopreservation. In the case of seed preservation, the water content of *V. lamellata* fresh seeds was 34.6%, then decreased to 4.2% after desiccation for 24 h. The germination percentage of *Phal. aphrodite* subsp. *formosana*, *V. lamellata* and *V. denisoniana* fresh seeds were 77.5, 93.8 and 100.0%, respectively. The germination percentage of seeds that were directly placed in LN was low (0.0, 0.0 and 1.6%) after thawing, instead, the percentage increased to 88.0, 100.0 and 100.0% for seeds dried with silica gel for 24 h prior to cryopreservation for 24 h, respectively. These findings demonstrate that the seeds of *V. lamellata* exhibit a high tolerance toward desiccation and is suitable to be preserved at low temperature for long-term, and can be considered as an orthodox seed storage. Therefore, silica gel desiccation could be also applied for *P. tankervilleae* pollens, *Phal. aphrodite* subsp. *formosana* seeds, *V. lamellata* seeds and *V. denisoniana* seeds prior to cryopreservation.

Key words: Orchid, Desiccation method, Genetic resource, Preservation for long-term.

Received: May 29, 2020; Accepted: September 16, 2020.

* Corresponding author, e-mail: yschang@ntu.edu.tw

1 Associate Research Fellow and Head, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yulin County, Taiwan, ROC.

2 Project Assistant, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yulin County, Taiwan, ROC.

3 Research Fellow and Division Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

4 Research Fellow and Head, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yulin County, Taiwan, ROC.

5 Research Fellow and Center Director, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yulin County, Taiwan, ROC.

6 Professor, Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University, Taipei City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(4):298–311 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202012_69(4).0004

研究報告

甘藷誘變品系耐鹽性之研究

陸柏憲[1,*]　詹庭筑[2]　賴永昌[3]

摘要

陸柏憲、詹庭筑、賴永昌。2020。甘藷誘變品系耐鹽性之研究。台灣農業研究 69(4):298–311。

本試驗以甘藷 (*Ipomoea batatas*) 誘變品系 (P、13、17、87、89) 與對照品種「台農 57 號」、「紅心尾」為材料，分別於組織培養、盆栽及田間三方面進行鹽分逆境試驗，分析甘藷於鹽分逆境下之外表型性狀及生理反應，以評估參試品系 (種) 之鹽分耐受性。試驗結果顯示，不同誘變品系之耐鹽指數 (salt tolerance index; STI) 因不同性狀而異，且隨鹽分濃度增加而下降；組培苗期性狀於 0.5% 鹽分濃度下表現穩定，當鹽分濃度達 1.0% 時，甘藷生長明顯受到抑制，其中誘變品系以 13、89 號之根長表現最佳。此外，盆栽試驗結果顯示，甘藷以 150 mM NaCl 處理下塊根重量表現穩定，以誘變品系 87 號之 STI 為最高，且甘藷塊根累積大量 Na^+ 及麥芽糖含量增加，推測為參試品系具較強耐鹽性之原因。進一步評估田間試驗之結果，鹽分逆境對甘藷地上部之負面影響較輕微，而對根部有較大之負面效應，導致甘藷產量降低，但減產程度因不同品系 (種) 而異，其中以「紅心尾」、P 及 87 號產量顯著較高。綜合所有試驗結果，在鹽分逆境條件下，甘藷誘變品系 P、87 號於整個栽培期可正常生長且塊根產量較高，顯示兩品系有較高之鹽分耐受性，可供台灣未來育種選用之耐鹽甘藷雜交親本。

關鍵詞：甘藷、誘變品系、耐鹽性。

前言

作物栽培生產過程中，生物性或非生物性逆境常是限制作物生長發育的環境因子，其中因土壤鹽化所造成的影響屬於非生物性逆境，嚴重限制現今農業發展與土地利用。依據美國農業部 (United States Department of Agriculture; USDA) 訂定之分類標準，土壤 pH 值 < 8.5、飽和抽出液電導度 (electrical conductivity; EC) ≥ 4 dS m^{-1} 時，稱之為鹽土 (saline soil) (United States Department of Agriculture 1975; Zaman *et al*. 2018)。全球土壤鹽化面積根據不同研究者的估算而略有差異，Massoud (1981) 指出在全球 1.5×10^9 ha 已開墾的可耕地中，約有 3.4×10^8 ha 為鹽土。另根據聯合國糧農組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) 之統計，全球約有 9.32×10^8 ha 的土壤受鹽分所影響 (Abrol *et al*. 1988)。此外，根據 FAO 之官方網站指出，全球可耕及不可耕地中，近 2.3×10^8 ha 的水田中約有 4.5×10^7 ha 受鹽分影響；近 1.5×10^9 ha 的旱田中約有 3.2×10^7 ha 的土壤受鹽分影響 (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2000)。就台灣土壤而言，受鹽分影響之土壤多分布在西部沿海地區，面積約有 2.5×10^4 ha，主要由於海水倒灌及過量施用肥料所致 (Chen *et al*. 2015)。值得注意的是，由於灌溉農業等人類活動所造

投稿日期：2020 年 8 月 7 日；接受日期：2020 年 9 月 28 日。
* 通訊作者：hsien0823@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會台中區農業改良場作物改良課助理研究員。台灣 彰化縣。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

成之土壤次生鹽鹼化作用 (secondary salinization)，未來全球受鹽分影響之土壤面積仍會持續增加 (Oldeman *et al*. 1991)。

為因應未來氣候變遷、人口成長及土壤鹽鹼化所帶來的糧食安全危機，鹽土的合理開發與利用已是現今農業重要課題 (Vargas *et al*. 2018)。透過土壤改良技術，如淋洗、客土、刮除等方法，可有效改善土壤鹽鹼化的問題 (Zaman *et al*. 2018)。此外，利用育種技術改良作物耐鹽性，選拔適合於鹽地栽培之耐鹽品種，亦是可行策略。針對作物耐鹽性之評估指標，主要可分為兩大類：一是基於作物之耐鹽生理調節機制之分生指標，如無機離子 (K^+、Ca^{2+}、Cl^- 等)、可溶性糖、有機酸、活化氧族 (reactive oxygen species; ROS) 清除系統等 (Taji *et al*. 2002; Ueda *et al*. 2003; Medeiros *et al*. 2014)；另一則是基於作物於鹽分逆境下表現之典型農藝性狀，如發芽率、存活率、相對生長率、株高及產量等 (Zeng *et al*. 2002; Katerji *et al*. 2003; Parida & Das 2005; Grieve *et al*. 2012)。Grieve *et al*. (2012) 評估不同作物在鹽分逆境下之相對產量，並劃分成四種相對耐鹽等級：耐鹽 (tolerant)，如大麥 (*Hordeum vulgare* L.)、棉花 (*Gossypium hirsutum* L.)、燕麥 (*Avena sativa* L.) 等；中度耐鹽 (moderately tolerant)，如高粱 [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]、大豆 (*Glycine max* L.)、小麥 (*Triticum aestivum* L.) 等；中度感鹽 (moderately sensitive)，如甘藷 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]、玉米 (*Zea mays* L.)、花生 (*Arachis hypogaea* L.)、馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.) 等；感鹽 (sensitive)，如水稻 (*Oryza sativa* L.)、芝麻 (*Sesamum indicum* L.)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 等。

甘藷為旋花科 (Convolvulaceae) 之一年生草本作物，主要以莖蔓進行扦插繁殖，與馬鈴薯、樹薯並列為世界三大薯類，主要食用部位為地下塊根，是全球的主要糧食之一 (Yu *et al*. 2016)。近年甘藷於台灣之栽培面積約維持在 10,000 ha，主要用途以鮮食、食品加工為主，為台灣非常重要的雜糧作物 (Lai *et al*. 2008)。台灣甘藷之育種研究迄今雖已育出高產、食味與品質佳及富含機能性之優質品種 (Li & Liao 1994; Lai *et al*. 2008)，但以往之育種程序中並無特別針對耐鹽特性進行選拔評估，以至較少有適合於鹽土中栽培之耐鹽品種育成，亦少有甘藷耐鹽特性之相關研究。在缺乏耐逆境種原之情形下，除透過種間雜交、基因轉殖等方法外，利用物理或化學誘變產生遺傳變異也是獲得耐逆境材料的方法。育種家利用化學誘變劑疊氮化鈉 (sodium azide; NaN_3) 與甲基磺酸乙酯 (ethyl methane sulfonate; EMS) 應用於水稻誘變育種，已獲得耐鹽、耐旱等耐非生物逆境之水稻種原 (Wang *et al*. 2002; Wu 2013; Chou *et al*. 2015)，顯示以誘變方式改變作物特性、擴大作物遺傳變異，以獲得目標性狀是可行的策略。

隨著未來土壤次生鹽鹼化面積逐漸增加之趨勢，若能培育、選拔出耐鹽甘藷品種，並於受鹽分影響之土壤上栽培生產，可使鹽化土壤產生較好的經濟和生態效益，亦可舒緩全球因氣候變遷、人口增長而造成之糧食與能源危機。本文以經 NaN_3 誘變甘藷「台農 73 號」(‘Tainung No. 73’; ‘TN73’) 雜交種子所獲之誘變品系 (P、13、17、87、89) 為材料，分別於組織培養、盆栽及田間試驗三方面進行鹽分逆境處理，分析甘藷於鹽分逆境下之生理反應及農藝性狀表現，以評估參試品系 (種) 之鹽分耐受性，期能作為未來甘藷耐鹽品種改良，以及展開甘藷耐鹽性相關研究之參考。

材料與方法

供試材料

試驗材料來自行政院農委會農業試驗所嘉義分所之甘藷誘變品系，其來源係利用「台農 73 號」種子經疊氮化鈉 (NaN_3) 誘變後而得 (品系代號：P、13、17、87、89)。試驗對照品種為「紅心尾」 (‘Hong Xin Wei’)、「台農 57 號」(‘Tainung No.57’; ‘TN57’) ，「紅心尾」為澎湖地區常見之主要栽培品種，特性為具有較佳之鹽分耐受性；‘TN57’ 為全台種植面積最廣之黃皮黃肉品種，特性為塊根食味佳且產量及品質穩定。

建立甘藷誘變品系瓶苗

甘藷誘變品系 (P、13、17、87、89) 定植於溫室中，待其生長至一定長度後剪取先端苗，去除葉片及葉柄，利用節間進行組織培養。將甘藷節間放置流動清水清洗 1 h，再以 2% (v/v) 次氯酸鈉水 (hypochlorous acid) 消毒 20 min 後，以無菌水清洗 3 次。將消毒完成之節間接種於 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類培養基 (含 30 g L^{-1} 蔗糖、30 g L^{-1} Na-alginate，pH 5.7 ± 0.1)。接種後之甘藷瓶苗置於溫度 25℃ ± 2℃、光照週期 16 h 之環境中培養繁殖。

甘藷誘變品系組織培養耐鹽試驗

剪取甘藷誘變品系 (P、13、17、87、89) 及 ‘TN57’ 之瓶苗節間 (約 2 cm) 作為試驗材料，接種於含 MS 基本鹽類培養基 (成分同瓶苗) 之試管中。培養基中添加不同重量百分比之氯化鈉 (sodium chloride; NaCl) 處理，包含 0.0、0.5 及 1.0% (0.00、85.99 及 172.84 mM)。接種後之試管置於溫度 25℃ ± 2℃、光照週期 16 h 之環境中生長。在不同鹽分濃度處理後 30 d，調查莖長、根長、株高 (莖長與根長之和) 及鮮重等苗期性狀。每支試管接種一條甘藷節間視為 1 重複，每個處理共作 8 重複。

甘藷誘變品系耐鹽盆栽試驗

試驗材料源於田間繁殖之甘藷誘變品系 (P、13、17、87、89)、「紅心尾」及 ‘TN57’，剪取先端苗扦插於盆栽中進行試驗。對照組每週澆灌 0 mM NaCl，處理組每週澆灌 150 mM (約 0.87% w/w) NaCl，持續 140 d 後採收，並於收穫後測量塊根重量、塊根鈉含量及塊根醣類分析。每個盆栽扦插兩株甘藷苗，視為 1 重複，共設置 2 重複。

塊根鈉含量委託財團法人食品工業發展研究所代為分析。塊根醣類含量分析包含葡萄糖 (glucose)、果糖 (fructose)、蔗糖 (sucrose) 及麥芽糖 (maltose)。試驗方法參考 Picha (1985) 之步驟，取 5 g 之甘藷泥加入 80% 乙醇，混合均勻後置入 80℃熱水中，隔水加熱萃取 3 次。萃取液過濾後定量至 10 mL，再以 0.45 μm 拋棄式針筒過濾器過濾後，進行高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析 (pump model No. LC1150, GBC Scientific Equipment, Dandenong, Australia)。使用 reverse phase C18 分析管柱 (Model No. LiChrolut RP-18, Merck, Darmstadt, Germany)，流動相 (mobile phase) 組成為 80% 的氰甲烷 (acetonitrile) 與 20% 的純水，流速為 1 mL min^{-1}，管柱加熱溫度為 45℃。HPLC 分析時所使用之 4 種醣類標準品，購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

甘藷誘變品系一般田間栽培試驗

試驗材料源自已於田間繁殖之甘藷誘變品系 (P、13、17、87、89) 及 ‘TN57’，剪取先端苗扦插於農業試驗所嘉義分所之普通田間進行試驗。每個甘藷品系 (種) 種植 3 行各 6 m，行距 1.10 m，株距為 0.25 m，視為一小區 (plot)，共進行 3 重複。種植前進行整地，採畦作栽培，肥料用量為 110 (N)-55 (P_2O_5)-220 (K_2O) kg ha^{-1}，作為基肥一次施用。其餘栽培管理及病蟲害防治，依一般甘藷田間栽培管理模式進行。本次田間試驗之期作為 2018 年秋作，栽培期共 150 d。於收穫後調查小區地上部重量、塊根產量及收穫指數。

台南市七股區鹽土種植試驗

種植材料源自已於田間繁殖之耐鹽甘藷品系 (P、13、17、87、89)、「紅心尾」及 ‘TN57’，剪取先端苗作為試驗材料，扦插於台南市七股區之鹽化土壤進行試驗。該田區土壤經電導度計 (Spectrum 2265 FSTP, Spectrum Technologies, Aurora, IL, USA) 與 pH/EC 計測定土壤 EC 值為 5.31 dS m^{-1}、土壤 pH 值為 7.28，符合 USDA 定義鹽土之標準 (EC 值 ≥ 4 dS m^{-1}、土壤 pH 值 < 8.5)。甘藷參試品系 (種) 之試驗規劃及栽培管理同於前述一般田間栽培試驗。本次鹽土田間試驗之期作為 2019 年秋作，栽培期共 150 d。於收穫後調查小區地上部重量、塊根產量及收穫指數。

耐鹽指數 (salt tolerance index; STI)

試驗中各性狀之 STI 值為鹽分處理組與對照組之比值，數值越高則代表耐鹽性越佳，其運算公式：STI = NaCl – treated value/control value。

試驗設計

組織培養及盆栽試驗採完全隨機設計 (complete randomized design; CRD)，田間試驗採完全隨機區集設計 (randomized complete block design; RCBD)。試驗所得數據計算平均值與標準誤 (standard error of mean; SEM)，並以套裝軟體 RStudio 進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)。若處理因子達顯著差異 (P < 0.05)，則進一步利用最小顯著差異測驗法 (least significant difference; LSD) 比較處理間均值。

結果

甘藷誘變品系組織培養耐鹽試驗

以甘藷誘變品系 (P、13、17、87、89) 及對照品種 ‘TN57’ 為材料，接種於含 0.0%、0.5%、1.0% NaCl 之 MS 基本鹽類培養基中 (含 30 g L^{-1} 蔗糖、30 g L^{-1} Na-alginate，pH 5.7 ± 0.1)。經 30 d 後調查試管苗之株高、莖長、根長及鮮重等苗期性狀 (表 1)。株高之試驗結果顯示 (表 1A)，參試品系 (種) 於 0.5% NaCl 下與 0.0% 對照組未達 5% 顯著差異，且各品系 (種) 之間亦無顯著差異；而各品系 (種) 之 STI 值多接近 1，且 ‘TN57’、P、13、89 號達 1 以上。當鹽分濃度達 1.0% 時，參試品系 (種) 之株高顯著下降，僅 13 號未達 5% 顯著差異；在不同參試品種中，以 13、17、89 號株高顯著最高；於 1.0% 鹽分濃度下之 STI 值大幅下降，以 89 號 (0.81) 為最高。

在莖長性狀方面 (表 1B)，0.5% NaCl 處理組與 0.0% 對照組相比未達 5% 顯著差異，且各參試品系 (種) 間亦無顯著差異。當鹽分濃度為 0.5% 時，STI 值介於 0.86 與 1.32 之間，以 ‘TN57’ 之 STI 值為最高。當鹽分濃度達 1.0% 時，莖部生長明顯受到抑制，以 17、89 為最長，其餘品系 (種) 次之；此時 STI 值亦大幅降低，以 89 號 (0.75) 為最高。

在根長性狀方面 (表 1C)，當鹽分濃度為 0.5% 時，處理組與 0.0% 對照組未達 5% 顯著差異，且各參試品系 (種) 間亦無顯著差異；STI 值介於 0.94–1.26 之間，以誘變品系 P 為最高。當鹽分濃度達 1.0% 時，部分甘藷品系根部生長明顯受到抑制，根長顯著下降，僅誘變品系 13、89 號未達 5% 顯著差異；各品系 (種) 之間無顯著差異，STI 值皆大幅度下降，以誘變品系 13 號 (0.87) 為最高。

於植株鮮重方面 (表 1D)，當鹽分濃度為 0.5% 時，與 0.0% 對照組相比部分品系鮮重出現顯著增加的情形，如 ‘TN57’、13、17 號，其 STI 值達 1.99、1.40 及 1.51；各參試品系 (種) 中以 13、17、89 號顯著最重。當鹽分濃度達 1.0% 時，各品系之鮮重有顯著下降的表現，皆低於 0.0% 對照組與 0.5% 處理組，而僅 ‘TN57’ 與 0.0% 對照組無顯著差異；各品系 (種) 之間以誘變品系 89 號顯著較重；各參試品系 (種) 之 STI 值皆低於 0.5，以 ‘TN57’ (0.47) 為最高。

綜合上述結果，參試品系 (種) 之耐鹽程度有相似的表現，皆在 0.5% 鹽分濃度下與 0.0% 對照組相比未達 5% 顯著差異，可以正常生長發育，且 ‘TN57’ 及部分品系更有促進生長的情況 (STI 值大於 1.0)。然而當鹽分濃度達 1.0% 時，‘TN57’ 及參試品系之生長發育顯著受到抑制，不論是莖長、根長、株高或鮮重，皆有明顯下降之表現，且各品系之 STI 值大幅下降，僅部分品系仍可維持 0.5 以上。此外，由試驗結果顯示，參試品系 (種) 在不同性狀下亦有不同程度的耐鹽表現，在 0.5% 鹽分濃度時，‘TN57’ 在株高、莖長、鮮重之 STI 皆是最高，呈現相當不錯的耐鹽性；然而當鹽分濃度為 1.0%，株高、莖長 STI 值則以 89 號品系為最高，根長以 13 號為最高。

甘藷誘變品系耐鹽盆栽試驗

以甘藷誘變品系 (P、13、17、87、89) 及對照品種 ‘TN57’、「紅心尾」為材料，取先端

表 1. 不同 NaCl 濃度對甘藷品系 (種) 組織培養苗之影響。

Table 1. Effect of different concentrations (0.0, 0.5 and 1.0%) of NaCl on *in vitro* sweet potato traits.

Treatment	Variety and mutant lines of sweet potato					
	'TN57'	P	13	17	87	89
(A) Plant height (cm)						
0.0% NaCl	14.75 ± 0.65 bA[z]	15.25 ± 0.93 bA	14.38 ± 0.72 bA	17.56 ± 1.02 aA	15.11 ± 0.82 bA	11.00 ± 0.53 cAB
0.5% NaCl	17.06 ± 1.23 aA	17.24 ± 1.11 aA	15.63 ± 1.43 aA	16.75 ± 1.10 aA	14.90 ± 4.05 aA	12.56 ± 0.74 aA
STI[y]	1.16	1.13	1.09	0.95	0.99	1.14
1.0% NaCl	4.30 ± 1.69 bcB	3.61 ± 1.36 bcB	10.80 ± 2.59 aA	6.59 ± 2.24 abcB	2.85 ± 0.89 cB	8.88 ± 1.90 abB
STI	0.29	0.24	0.75	0.38	0.19	0.81
(B) Shoot length (cm)						
0.0% NaCl	3.03 ± 0.18 bA	4.90 ± 0.28 aA	3.95 ± 0.44 bA	4.93 ± 0.34 aA	3.91 ± 0.40 bA	3.78 ± 0.24 bA
0.5% NaCl	4.00 ± 0.66 aA	4.24 ± 0.18 aA	3.98 ± 0.14 aA	4.86 ± 0.33 aA	4.13 ± 0.42 aA	4.60 ± 0.21 aA
STI	1.32	0.86	1.01	0.99	1.05	1.22
1.0% NaCl	1.81 ± 0.12 bB	1.68 ± 0.22 bB	1.84 ± 0.14 bB	2.53 ± 0.24 aB	1.81 ± 0.21 bB	2.84 ± 0.38 aB
STI	0.60	0.34	0.47	0.51	0.46	0.75
(C) Root length (cm)						
0.0% NaCl	11.73 ± 0.52 aA	10.35 ± 1.06 aA	10.43 ± 0.78 aA	12.64 ± 1.14 aA	11.20 ± 0.72 aA	7.23 ± 0.54 aA
0.5% NaCl	13.06 ± 1.19 aA	13.00 ± 0.96 aA	11.65 ± 1.46 aA	11.89 ± 1.11 aA	10.98 ± 3.75 aA	7.96 ± 0.74 aA
STI	1.11	1.26	1.12	0.94	0.98	1.10
1.0% NaCl	4.05 ± 2.01 aB	3.61 ± 1.79 aB	9.03 ± 2.61 aA	3.88 ± 2.05 aB	1.14 ± 0.76 aB	5.60 ± 1.42 aA
STI	0.35	0.35	0.87	0.31	0.10	0.78
(D) Fresh weight (g)						
0.0% NaCl	0.26 ± 0.03 cB	0.49 ± 0.04 abA	0.53 ± 0.09 abB	0.57 ± 0.06 aB	0.37 ± 0.04 bcA	0.59 ± 0.07 aA
0.5% NaCl	0.52 ± 0.09 bcA	0.57 ± 0.07 bcA	0.74 ± 0.05 abA	0.86 ± 0.12 aA	0.34 ± 0.10 cA	0.63 ± 0.12 abA
STI	1.99	1.17	1.40	1.51	0.93	1.05
1.0% NaCl	0.12 ± 0.02 bcB	0.10 ± 0.01 bcB	0.22 ± 0.05 abC	0.16 ± 0.03 abcC	0.09 ± 0.02 cB	0.27 ± 0.07 aB
STI	0.47	0.21	0.41	0.28	0.24	0.46

[z] Mean ± standard error. Means within each row (in small letter) and within each column (in capital letter) followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

[y] STI: salt tolerance index.

苗扦插於盆栽中進行耐鹽試驗。試驗分成控制組 (澆灌 0 mM NaCl) 與氯化鈉處理組 (每週澆灌 150 mM NaCl)，持續 140 d 後採收，並於收穫後測量甘藷塊根重量、鈉含量及醣類分析 (圖 1)。

盆栽試驗結果顯示 (表 2)，150 mM NaCl 處理組以「紅心尾」有最重之塊根，而 'TN57'、13、87、89 與「紅心尾」無顯著差異，誘變品系 17 號塊根顯著較輕。另一方面，僅誘變品系 87 號與 0 mM NaCl 控制組相比出現顯著差異，多數未達 5% 顯著差異。部分參試品系 (種) STI 值大於 1.0，如 'TN57' (1.06)、「紅心尾」 (1.21)、13 號 (1.02) 與 87 號 (1.47)，而 P (0.83)、17 (0.78)、89 (0.74) 之 STI 值則皆小於 1.0。

進一步分析甘藷塊根鈉離子之含量 (表 3)，0 mM NaCl 控制組以誘變品系 17 號塊根有顯著最高之含量，而 'TN57'、P、13 及 89 號則與 17 號無顯著差異，而以「紅心尾」及 87 號顯著較低。在 150 mM NaCl 處理組中，以誘變品系 17 號有顯著最高之鈉離子含量，其餘各參試品系 (種) 次之，且彼此間無顯著差異。此外，150 mM NaCl 處理組之塊根鈉離子含量與 0 mM NaCl 控制組相比，各參試品種 (系) 皆有顯著增加的情況。就 STI 值之結果，「紅心尾」、87、89 號皆約 9.00 左右為最高，P、13 及 17 號次之，'TN57' 僅 3.98 為最低。

甘藷塊根醣類分析之結果 (圖 1) 顯示 'TN57' 於 0 mM 控制組之葡萄糖、果糖、麥芽糖及蔗糖依序為 0.72、0.52、5.15 及 0.84 mg L^{-1}；150 mM NaCl 處理組為 0.74、0.53、12.15 及 0.00 mg L^{-1} (低於偵測極限)。「紅心尾」於 0 mM 控制組依序為 2.02、1.67、4.66 及 0.09 mg L^{-1}；150 mM NaCl 處理組為 2.01、1.16、5.32 及 0.35 mg L^{-1}。誘變品系 P 於 0 mM 控制組依序為 2.51、1.86、4.76 及 0.60 mg L^{-1}；150 mM NaCl 處理組為 1.88、1.36、11.96 及 0.00 mg L^{-1} (低於偵測極限)。誘變品系 13 號於 0 mM 控制組依序為 2.70、1.57、3.79 及 0.43 mg L^{-1}；150 mM NaCl 處理組為 2.32、1.18、8.71 及 0.00 mg L^{-1} (低於偵測極限)。誘變品系 17 號於 0 mM 控制組依序為 1.79、0.95、8.34 及 1.40 mg L^{-1}；150 mM NaCl 處理組為 0.93、0.59、12.37 及 0.21 mg L^{-1}。誘變品系 87 號於 0 mM 控制組依序為 2.11、1.04、3.27 及 0.29 mg L^{-1}；150 mM NaCl 處理組為 2.18、1.01、5.24 及 0.00 (低於偵測極限)。誘變品系 89 號於 0 mM 控制組依序為 2.02、1.48、5.83 及 0.19 mg L^{-1}；150 mM NaCl 處理組為 1.18、1.08、9.49 及 0.12。綜合前述結果，'TN57'、「紅心尾」、P、13、87 號葡萄糖含量變化不顯著；而 17、89 號則有下降的趨勢。此外，「紅心尾」、17 及 89 號果糖含量也有下降之表現。值得注意的是，150 mM NaCl 處理組之參試品系 (種) 中，麥芽糖含量皆明顯高出 0 mM 控制組。而蔗糖含量方面除「紅心尾」是增加外，其餘各品系 (種) 則是明顯下降，其中 P、13、87 號與 'TN57' NaCl 處理組之塊根，蔗糖含量甚至低於偵測極限。

甘藷誘變品系田間試驗

以甘藷誘變品系 (P、13、17、87、89) 及對照品種 'TN57'、「紅心尾」為材料進行田間栽培試驗，於 2018 年秋作定植於一般甘藷栽培田區、2019 年秋作定植於台南市七股區之鹽土田區 (EC 值為 5.31 dS m^{-1})。經 150 d 栽培期後收穫，並調查小區地上部重量、塊根產量及收穫指數。試驗結果顯示 (表 4)，一般田區之參試品種中，以誘變品系 87、17 及 89 號地上部重量較高，且三者間未達 5% 顯著差異；P、13 號及 'TN57' 較低，且三者無顯著差異。就小區產量之結果，以 P 及 'TN57' 為最高，而 13、17、87、89 次之，且四者間無顯著差異。各參試品系 (種) 之收穫指數差異介於 0.44 至 0.64 之間，以 'TN57' (0.64) 為最高，誘變品系 P (0.63) 次之，而 13、17、87、89 號較低。鹽土田區之栽培試驗結果，地上部重量以 13、87 號顯著較重，且與 P、89 號無顯著差異；對照品種 'TN57'、「紅心尾」與 17 號則顯著較輕。就塊根產量而言，鹽土田區下之 'TN57' 與各參試品系未達 5% 顯著差異；以「紅心尾」、P、87 號顯著較高，而 13、17 及 89 號顯著較低。就收穫指數而言，各參試品系 (種) 變異程度較廣，介於 0.17 至 0.62 之間；'TN57' 達 0.62 為最高，其次為「紅心尾」、17 號及 P，

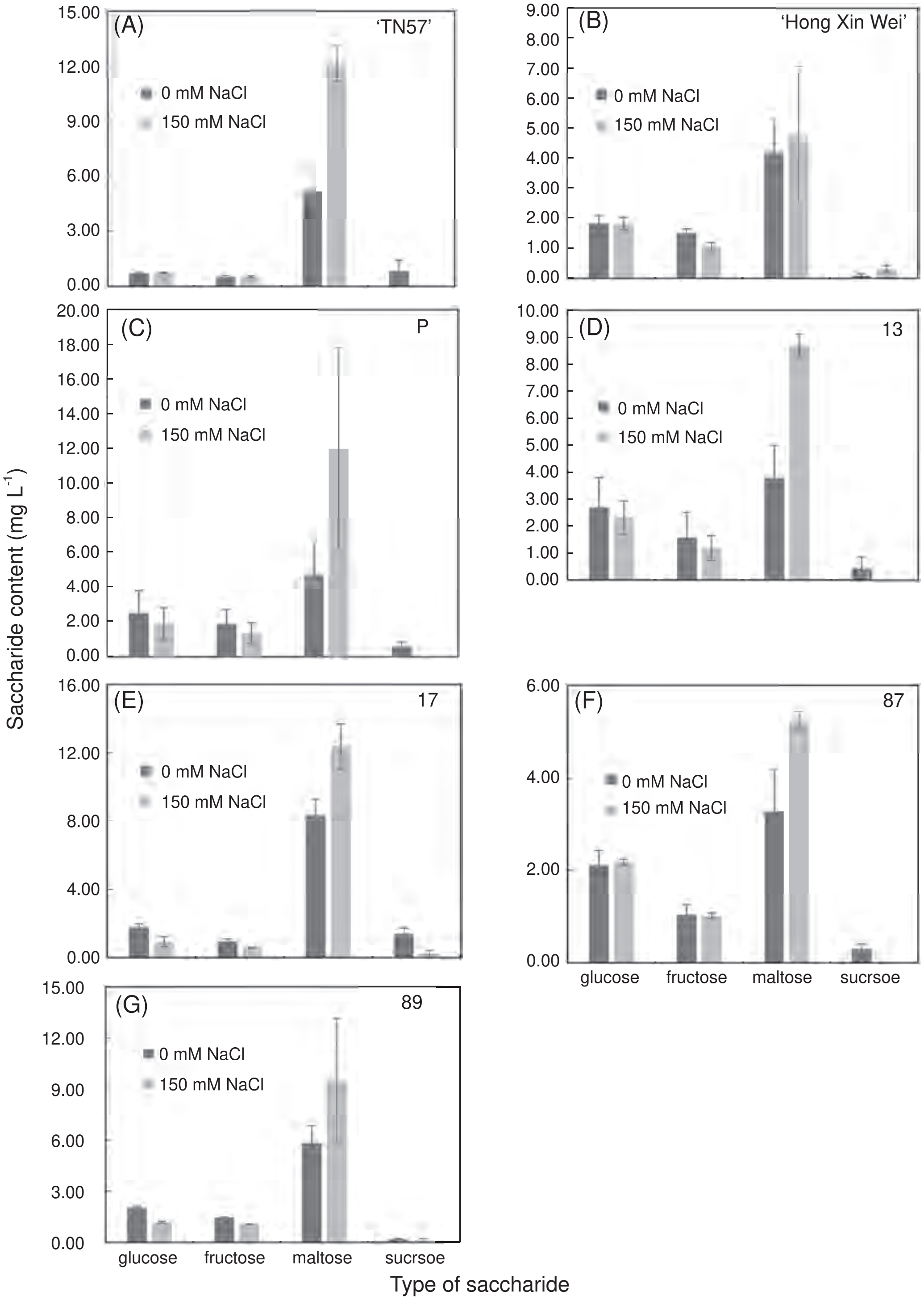


圖1. 150 mM NaCl處理下甘藷品系(種)塊根之醣類分析。(A) 'TN57';(B)「紅心尾」;(C) P;(D) 13;(E) 17;(F) 87;(G) 89。

Fig. 1. Changes of the soluble sugar content of sweet potato mutant tubers under 150 mM NaCl. Vertical bars indicate standard error of mean. (A) 'TN57'; (B) 'Hong Xin Wei'; (C) P; (D) 13; (E) 17; (F) 87; and (G) 89.

表 2. 150 mM NaCl 處理對甘藷品系 (種) 塊根重量之影響。

Table 2. Effect of 150 mM NaCl on sweet potato tuber weight.

	Variety, line and mutant lines of sweet potato						
Tuber weight (g)	'TN57'	'Hong Xin Wei'	P	13	17	87	89
0 mM NaCl	564.5 ± 6.5 aA[z]	560.3 ± 15.3 abA	376.8 ± 83.0 bcA	501.9 ± 43.7 abcA	321.9 ± 33.9 cA	345.1 ± 86.9 cB	506.0 ± 62.4 abcA
150 mM NaCl	596.5 ± 50.5 abA	678.5 ± 53.5 aA	314.5 ± 27.5 bcA	512.0 ± 63.0 abcA	249.8 ± 56.3 cA	506.5 ± 16.9 abcA	376.8 ± 100.2 abcA
STI[y]	1.06	1.21	0.83	1.02	0.78	1.47	0.74

[z] Mean ± standard error. Means within each row (in small letter) and within each column (in capital letter) followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

[y] STI: salt tolerance index.

表 3. 150 mM NaCl 處理對甘藷品系 (種) 塊根鈉離子含量分析。

Table 3. The sodium ion content of sweet potato mutant tubers under 150 mM NaCl.

Sodium ion	Variety, line and mutant lines of sweet potato						
(mg 100 g^{-1})	'TN57'	'Hong Xin Wei'	P	13	17	87	89
0 mM NaCl	28.5 ± 8.5 abB[z]	9.8 ± 0.1 bB	25.0 ± 0.2 abB	22.5 ± 6.2 abB	42.4 ± 17.3 aB	14.2 ± 1.8 bB	16.6 ± 2.7 abB
150 mM NaCl	113.4 ± 0.4 bA	89.8 ± 7.6 bA	126.0 ± 30.3 bA	116.9 ± 36.1 bA	272.5 ± 27.8 aA	139.2 ± 29.0 bA	148.2 ± 45.3 bA
STI[y]	3.98	9.19	5.05	5.20	6.43	9.80	8.91

[z] Mean ± standard error. Means within each row (in small letter) and within each column (in capital letter) followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

[y] STI: salt tolerance index.

表 4. 甘藷品系 (種) 於田間試驗與鹽土試驗之農藝性狀表現。

Table 4. The agronomy traits of sweet potato mutants under normal and saline soil field.

Cultivation environment		Variety, line and mutant lines of sweet potato						
and crop season	Trait	'TN57'	'Hong Xin Wei'	P	13	17	87	89
Normal soil field	Stem weight (kg $plot^{-1}$)[z]	10.6 ± 0.2 d[y]	-	13.5 ± 1.7 cd	14.7 ± 3.3 bcd	18.0 ± 1.6 ab	20.4 ± 2.6 a	17.4 ± 1.8 abc
Fall Crop 2018	Yield (kg $plot^{-1}$)	19.2 ± 0.4 ab	-	22.8 ± 2.0 a	16.4 ± 1.6 bc	14.0 ± 0.9 c	16.1 ± 2.0 bc	14.6 ± 0.6 bc
	Harvest index	0.64	-	0.63	0.53	0.44	0.44	0.46
Saline soil field	Stem weight (kg $plot^{-1}$)	5.3 ± 0.2 b	10.6 ± 1.8 b	15.0 ± 1.6 ab	23.7 ± 3.5 a	5.4 ± 0.4 b	27.7 ± 5.9 a	15.8 ± 5.4 ab
Fall Crop 2019	Yield (kg $plot^{-1}$)	8.6 ± 0.3 abc	12.3 ± 2.7 ab	11.9 ± 4.3 ab	5.0 ± 0.2 c	4.4 ± 0.3 c	13.9 ± 3.0 a	6.2 ± 0.2 bc
	Harvest index	0.62	0.54	0.44	0.17	0.45	0.33	0.28

[z] The experiment was replicated three times with plot size of 6.0 m × 3.3 m. The sweet potato was planted in 1.10 m × 0.25 m of row and plant spacing.

[y] Mean ± standard error. Means within each row (in small letter) followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

而 13、87 與 89 號之收穫指數則較低。整合田間試驗之結果顯示，鹽土栽培之甘藷產量及收穫指數與一般田區相比皆有下降之表現。收穫指數以 ‘TN57’ 降幅最低，而 13 號下降最多。值得注意的是，雖然地下部的生長受到鹽分逆境之影響，但地上部卻有促進生長之情形發生，如 P、13、87 號等誘變品系其地上部莖葉重量高於一般田區。

討論

目前全球已超過 100 個國家出現土壤鹽化的現象，估計全球 3.1 × 10^8 ha 灌溉地區中約 20% 的土地受鹽分影響；而因海平面上升及次生鹽鹼化之衝擊下，預計鹽土面積將持續增加 (Qadir *et al*. 2014; Zaman *et al*. 2018)。當土壤中鹽分濃度過高時，將造成生物多樣性喪失及生態系統瓦解，且作物因鹽分逆境而導致減產或死亡 (Shahid 2013)。此外，根據 Qadir *et al*. (2014) 研究指出，全球因土壤鹽化導致土地退化，每年於作物栽培生產上的經濟損失估計高達 257 億美元。目前台灣鹽化土壤面積約為 2.5 × 10^4 ha 左右，主要分布於西部濱海地區，範圍約從彰化鹿港往南延伸至屏東枋寮一帶 (Chen *et al*. 2015)。為解決土壤鹽化造成的危機，除多種土壤改良方法及調整作物的栽培管理外，種植耐鹽作物或改良作物耐鹽性為另一可行策略 (Zaman *et al*. 2018)。

透過植物組織培養篩選耐逆境植株為一有效率之選拔方法 (Chandler *et al*. 1988; Vijayan *et al*. 2003; Zair *et al*. 2003; Dasgupta *et al*. 2008)，通常利用兩種方法進行：一是藉由體細胞變異或誘變劑誘導作物細胞突變，並從中進行篩選；另一則是直接從作物種原中行離體篩選 (*in vitro* screening)。Dasgupta *et al*. (2008) 以 15 個不同甘藷種原為材料，接種於含 3 個不同 NaCl 濃度 (0, 0.5 及 1.0% w/v) 之培養基中，並依據莖部及根部之個數及長度為選拔指標，成功篩選出 6 個感鹽品系 (未能於 0.5% NaCl 下生長)、3 個中等耐鹽品系 (能於 0.5% NaCl 下生長)，以及 6 個強耐鹽性之甘藷種原 (能於 1.0% NaCl 下生長)。本文亦利用 ‘TN57’ 及 5 個誘變甘藷品系之組培苗進行鹽分逆境試驗 (0.0、0.5 及 1.0%) (表 1)，結果發現 6 個參試品種 (系) 皆能於 0.5% 及 1.0% 鹽分逆境下生長，表示參試品種 (系) 皆有較強之耐鹽性。值得注意的是，於 0.5% 鹽分濃度下各性狀之耐鹽指數皆高於 0.9 以上，且有促進生長之趨勢；當鹽分濃度達 1.0%，植株生長才明顯受到抑制。另外，根據 Mukherjee (2001) 研究指出，培養基在添加 0.5% NaCl 下，4 種甘藷品種之反應都相當穩定，而在 1.0% NaCl 下生長開始下降，與本文之試驗結果相符。甘藷組培苗生長受到抑制，可能由於鹽分介質增加培養基的滲透勢，影響根部對水分及養分的吸收，進而抑制植株生長發育。加總 1.0% 鹽分濃度下各性狀之耐鹽指數，可初步將參試品系 (種) 苗期之相對耐鹽性由高到低排序：89、13、‘TN57’、17、P、87；另由於甘藷生產較注重塊根，若由根長性狀之耐鹽指數來說，誘變品系 13、89 號之苗期耐鹽性較佳。

在鹽分逆境下，土壤滲透勢降低，造成植株根部吸水困難，形成植株體內出現生理乾旱 (physiological drought) 的現象。為解決此困境，植物透過滲透調節 (osmotic adjustment) 作用，即分泌無機離子 (如 K^+、Ca^{2+}、Cl^- 等)、小分子有機酸、可溶性糖、脯氨酸 (proline)、甜菜鹼 (betaine)、山梨糖醇 (sorbitol) 等，降低細胞滲透勢，以利細胞能繼續吸收水分而恢復正常生長 (Ashraf & Harris 2004; Bartels & Sunkar 2005; Parida & Das 2005; Arzani 2008)。Wu *et al*. (2013) 以不同甜菜 (*Beta vulgaris* L.) 品種為材料，處理 4 種不同鹽分濃度 (0、50、100 及 200 mM) 後測量無機離子 (Na^+、K^+、Ca^{2+})、脯氨酸及可溶性糖 (文中採用蔗糖標準品) 等含量，結果顯示甜菜莖部及根部之 Na^+ 含量隨鹽分濃度增加而顯著上升，但於 200 mM 時根部可溶性糖 (蔗糖) 顯著降低。比較本文 150 mM NaCl 盆栽試驗，同樣發現所有參試品系 (種) 中，塊根鈉離子含量顯著增加 (表 3)，而 ‘TN57’ 及誘變品系之蔗糖含量皆下降 (圖 1)。本文 NaCl 處理組之總可溶性醣類 (葡萄糖、蔗糖、果糖、麥芽糖) 較控制組高，此與 Kitayama *et al*. (2020) 之研究相符，推測係因甘藷面臨鹽分逆境啟動滲透調

節之緣故；但進一步檢視不同醣類含量增減不一，非全數增加，此與 Hunsche *et al*. (2010) 在鹽分逆境下之番茄根部試驗結果相似。本次盆栽試驗塊根醣類分析中，葡萄糖、果糖及蔗糖皆有下降之趨勢，僅麥芽糖有顯著增加的情形 (圖 1)，而麥芽糖是否作為甘藷面臨鹽分逆境之重要醣類，以及可作為耐鹽性篩選指標仍需進一步試驗。

雖然 Na^+ 是植物生長之有益元素 (Kitayama *et al*. 2020)，但植物體內若有高濃度 Na^+，則會影響細胞水勢及胞內離子平衡，進而毒害細胞抑制植株生長。此外，濃度過高之 Na^+ 會與 K^+ 競爭酶上之 K^+ 結合位，導致 K^+ 離子平衡被干擾 (Tester & Davenport 2003; Bartels & Sunkar 2005; Grieve *et al*. 2012)。一般植物利用以下三種機制避免過量 Na^+ 之危害：(1) 根部限制對 Na^+ 之吸收；(2) 透過 Na^+/H^+ 反向運輸蛋白 (antiporter) 將 Na^+ 隔離於液胞中；(3) 透過 Na^+/H^+ 反向運輸蛋白將 Na^+ 反向排出細胞 (Bartels & Sunkar 2005; Grieve *et al*. 2012; Yu *et al*. 2016)。根據 Yu *et al*. (2016) 研究發現，甘藷根部主要透過將 Na^+ 隔離於液胞中以調節鹽分濃度下之離子平衡。Kitayama *et al*. (2020) 以 0、25 及 50 mM 之 NaCl 溶液處理兩甘藷品種，結果顯示塊根鈉含量隨鹽分濃度升高而增加，此與 Yu *et al*. (2016) 及本文試驗結果相符 (表 3)。經本文盆栽試驗，發現甘藷在 150 mM 鹽分逆境下塊根會累積大量 Na^+，而以誘變品系 17 號之含量顯著最高；此外，參試品系 (種) 中「紅心尾」、87 及 89 號與控制組相比，其累積之 Na^+ 含量高達近 9 倍。值得一提的是，研究指出栽培鹽生植物 (halophytes) 或耐鹽性高之植物可透過植株體內吸收並累積大量鹽分進行植生復育 (phytoremediation) 以改良鹽土 (Boonsaner & Hawker 2012; Jesus *et al*. 2015)。本文「紅心尾」及誘變品系 87、89 號於 150 mM 鹽分逆境下可累積大量 Na^+，且仍能維持正常生長發育，其具應用於植生復育以改良鹽土之潛力。

植物在面臨鹽分逆境時，經一系列耐鹽生理機制反應，最終於外表型表現。因此相對於生理指標，外表型指標更具耐鹽性之綜合意義。且外表型調查對於儀器及設備之要求較低，適用性高且易於進行為其優點。Parida & Das (2005) 指出植物遭遇鹽分逆境時，植物生長發育受到抑制，進一步導致生質量 (biomass) 降低、生產力下降或植株死亡。雖然鹽分逆境對所有植物皆有害，但不同物種之耐受性及致死濃度下之生長減少速率差異很大。根據 Dasgupta *et al*. (2008) 研究指出，隨鹽分濃度上升，甘藷培植體根、莖、葉等部位之性狀有顯著受抑制之現象，但抑制程度隨不同甘藷基因型而異，此與本文組織培養試驗於 1.0% NaCl 處理之結果相符。因此，研究者認為可依據在鹽分逆境下之外表型指標評估甘藷耐鹽性 (Dasgupta *et al*. 2008)。另一方面，本文鹽土試驗結果，顯示參式品種 (系) 於 EC 值為 5.31 dS m^{-1} 之鹽土仍可正常生長，但不同品系間之農藝性狀仍有顯著差異，表現不同耐鹽程度 (表 4)。此外，誘變品系 P、13、87 之地上部鮮重反而有高於一般田區之結果 (表 4)。整合本文組培、盆栽及田間試驗之結果，發現於鹽分逆境下甘藷莖部皆有促進生長之趨勢，推測可能是植物通過加速生長以降低體內鹽分濃度的緣故。

基於產量的耐鹽性指標篩選，可視為植株耐鹽性生理機制的整體表現，代表遺傳及環境效應對植物生長的綜合影響 (Arzani 2008)。Houshmand *et al*. (2005) 以 8 種不同杜蘭小麥 [*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn.] 品系為材料 (包含耐鹽與感鹽品系)，進行一般田及鹽土之田間比較試驗，並根據產量構成要素、產量及收穫指數等性狀評估小麥耐鹽性之表現。結果發現，由於鹽分影響，所有小麥品系之產量相關性狀皆顯著降低，此與本文田間試驗發現：栽培於鹽土之甘藷產量皆低於一般田區產量之結果大致相符 (表 4)。根據 Grieve *et al*. (2012) 研究指出，甘藷耐鹽指標之土壤 EC 域值 (threshold) 為 1.5 dS m^{-1}，當超過域值時即開始減產，且 EC 值每增加 1.0 dS m^{-1} 即減產 11%，被列為中等感鹽之作物。比較本次田間試驗之結果，參試品系 (種) 於鹽土 (EC 值為 5.31 dS m^{-1}) 栽培之甘藷產量較一般田區減產約 4 至 6 成，略高於 Grieve *et al*. (2012) 之研究結果。僅誘變品系 87 號減產約 14%，推測係因甘藷之遺傳組成為多倍

體且高度異質結合，並經 NaN_3 誘變後，不同基因型之個體遺傳變異較大的緣故。值得注意的是，鹽土田間試驗收穫時發現誘變品系地上部生長正常；而地下部以鬚根、鉛筆根居多，塊根數較少，推測是因為土壤鹽分逆境影響根部發育及光合產物之分配所致。就收穫指數而言，‘TN57’ 於一般田與鹽土差異不大，係因地上部及地下部在鹽土田區之生長皆受抑制；而誘變品系 P、13、87、89 號於一般田與鹽土之收穫指數差異較大，係因其地上部生長旺盛，而塊根收量降低的緣故。綜上所述，鹽分逆境對甘藷根部有較大之負面效應，而對地上部之負面影響較輕微。

植物耐鹽機制相當複雜且不同基因型間遺傳多樣性大，單一指標難以準確判斷耐鹽性之強弱。本文僅透過生理、外表型性狀與 STI 評估甘藷耐鹽性，未來仍需進一步針對甘藷進行耐鹽指標之相關分析，方能篩選出可確切代表甘藷耐鹽性強弱之性狀指標，建立綜合耐鹽性評價系統，進而使甘藷耐鹽性分析結果更具代表性。本文以經由 NaN_3 誘變而得之甘藷誘變品系為材料，於組培、盆栽及田間三方面試驗參試品系 (種) 之耐鹽性。由組培試驗結果顯示，甘藷苗期根部之耐鹽性以誘變品系 13、89 號為最佳；然而就盆栽試驗之結果而言，甘藷塊根以「紅心尾」、87 號之 STI 較高。此外，甘藷在鹽分逆境下會導致根部累積大量 Na^+ 及麥芽糖含量增加，其是否可作為耐鹽性篩選指標仍需進一步試驗。田間試驗之結果而言，誘變品系 P、87 號於栽培期可正常生長發育且產量較高，顯示兩品系對於鹽分逆境之耐受性較佳，未來可供作為甘藷耐鹽相關研究之種原材料，或甘藷耐鹽育種之親本來源，藉以因應全球土壤鹽化面積持續攀升之危機。

引用文獻

Abrol, I. P., J. S. P. Yadav, and F. I. Massoud. 1988. Salt-affected Soils and Their Management. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 131 pp.

Arzani, A. 2008. Improving salinity tolerance in crop plants: A biotechnological view. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 44:373–383. doi:10.1007/s11627-008-9157-7

Ashraf, M. and P. J. C. Harris. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Sci. 166:3–16. doi:10.1016/j.plantsci.2003.10.024

Bartels, D. and R. Sunkar. 2005. Drought and salt tolerance in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 24:23–58. doi:10.1080/07352680590910410

Boonsaner, M. and D. W. Hawker. 2012. Remediation of saline soil from shrimp farms by three different plants including soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. J. Environ. Sci. Health A 47:558–564. doi:10.1080/10934529.2012.650559

Chandler, S. F., K. Y. Paek, E. C. Pua, E. Ragolsky, B. B. Mandal, and T. A. Thorpe. 1988. The effectiveness of selection for salinity tolerance using *in vitro* shoot culture. Intl. J. Plant Sci. 149:166–172. doi:10.1086/337704

Chen, Z. S., Z. Y. Hseu, and C. C. Tsai. 2015. The Soils of Taiwan. Springer. Dordrecht, Germany. 127 pp. doi:10.1007/978-94-017-9726-9

Chou, S. Y., I. C. Tsai, W. J. Chang, and H. S. Wu. 2015. Salt tolerant characters of salt tolerant rice mutant CNY1031130. Crop Environ. Bioinform. 12:183–197. (in Chinese with English abstract) doi:10.30061/CEB.201512_12(4).0003

Dasgupta, M., M. R. Sahoo, P. C. Kole, and A. Mukherjee. 2008. Evaluation of orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes for salt tolerance through shoot apex culture under *in vitro* NaCl mediated salinity stress conditions. Plant Cell Tissue Organ Cult. 94:161. doi:10.1007/s11240-008-9400-2

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2000. Extent and causes of salt-affected soils in participating countries. http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/topic2.htm#top (visit on 03/01/2020)

Grieve, C. M., S. R. Grattan, and E. V. Maas. 2012. Plant salt tolerance. p.405–459. *in*: Agricultural Salinity Assessment and Management. 2nd ed. (Wallender, W. W. and K. K. Tanji, eds.) ASCE. Reston, VA. 1124 pp.

Houshmand, S., A. Arzani, S. A. M. Maibody, and M. Feizi. 2005. Evaluation of salt-tolerant genotypes of durum wheat derived from *in vitro* and field experiments. Field Crops Res. 91:345–354. doi:10.1016/j.fcr.2004.08.004

Hunsche, M., C. Lankes, H. Hoffstall, and G. Noga. 2010. Vegetative performance, leaf water potential, and partitioning of minerals and soluble sugars: Traits for ranking the NaCl-tolerance of tomato genotypes? Plant Growth Regul. 62:151–162. doi:10.1007/s10725-010-9500-y

Jesus, J. M., A. S. Danko, A. Fiúza, and M. T. Borges. 2015. Phytoremediation of salt-affected soils: A

review of processes, applicability, and the impact of climate change. Environ. Sci. Pollut. Res. Intl. 22:6511–6525. doi:10.1007/s11356-015-4205-4

Katerji, N., J. W. van Hoorn, A. Hamdy, and M. Mastrorilli. 2003. Salinity effect on crop development and yield, analysis of salt tolerance according to several classification methods. Agric. Water Manag. 62:37–66. doi:10.1016/S0378-3774(03)00005-2

Kitayama, M., T. Samphumphuang, R. Tisarum, C. Theerawitaya, K. Cha-um, M. Takagaki, and S. Cha-um. 2020. Calcium and soluble sugar enrichments and physiological adaptation to mild NaCl salt stress in sweet potato (*Ipomoea batatas*) genotypes. J. Hortic. Sci. Biotechnol. doi:10.1080/14620316.2020.1749532

Lai, Y. C., Z. T. Li, T. L. Jeng, and W. H. Tsai. 2008. Breeding of the new sweet potato variety, Tainung No. 73. J. Taiwan Agric. Res. 57:279–294. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2008.05704.05

Li, L. and C. H. Liao. 1994. The achievement and prospect of sweet potato breeding in Taiwan. p.11–28. *in*: Proceeding of a Symposium on Root Crop Yield Improvement, Processing and Utilization. November 25, 1993. Chiayi, Taiwan. Taiwan. Chiayi Agricultural Experiment Branch, TARI. Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Massoud, F. I. 1981. Salt affected soils at a global scale and concepts for control. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 21 pp.

Medeiros, C. D., J. R. C. Ferreira Neto, M. T. Oliveira, R. Rivas, V. Pandolfi, É. A. Kido, J. I. Baldani, and M. G. Santos. 2014. Photosynthesis, antioxidant activities and transcriptional responses in two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars under salt stress. Acta Physiol. Plant. 36:447–459. doi:10.1007/s11738-013-1425-4

Mukherjee, A. 2001. Effect of NaCl on axillary shoot proliferation in sweet potato. Ann. Trop. Res. 23:1–10.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Oldeman, L. R., R. T. A. Hakkeling, and W. G. Sombroek. 1991. World map of the status of human-induced soil degradation: An explanatory note. 2nd ed. International Soil Reference and Information Center. Vienna, Austria. 35 pp.

Picha, D. H. 1985. HPLC determination of sugars in raw and baked sweet potatoes. J. Food Sci. 50:1189–1190. doi:10.1111/j.1365-2621.1985.tb13045.x

Parida, A. K. and A. B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. Ecotoxical. Environ. Saf. 60:324–349. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.06.010

Qadir, M., E. Quillérou, V. Nangia, G. Murtaza, M. Singh, R. J. Thomas, P. Drechsel, and A. D. Noble. 2014. Economics of salt-induced land degradation and restoration. Nat. Resour. Forum 38:282–295. doi:10.1111/1477-8947.12054

Shahid, S. A. 2013. Irrigation-induced soil salinity under different irrigation systems- Assessment and management: Short technical note. Clim. Change Outlook Adapt. Intl. J. 1:19–24.

Taji, T., C. Ohsumi, S. Iuchi, M. Seki, M. Kasuga, M. Kobayashi, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 29:417–426. doi:10.1046/j.0960-7412.2001.01227.x

Tester, M. and R. Davenport. 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Ann. Bot. 91:503–527. doi:10.1093/aob/mcg058

Ueda, A., M. Kanechi, Y. Uno, and N. Inagaki. 2003. Photosynthetic limitations of a halophyte sea aster (*Aster tripolium* L.) under water stress and NaCl stress. J. Plant Res. 116:63–68. doi:10.1007/s10265-002-0070-6

United States Department of Agriculture. 1975. Soil Taxonomy: A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys. Soil Conservation Service and United States Department of Agriculture. Washington, DC. 754 pp.

Vargas, R., E. I. Pankova, S. A. Balyuk, P. V. Krasilnikov, and G. M. Khasankhanova. 2018. Handbook for Saline Soil Management. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Lomonosov Moscow State University. Moscow, Russia. 132 pp.

Vijayan, K., S. P. Chakraborti, and P. D. Ghosh. 2003. *In vitro* screening of mulberry (*Morus* spp.) for salinity tolerance. Plant Cell Rep. 22:350–357. doi:10.1007/s00299-003-0695-5

Wang, C. S., T. H. Tseng, and C. Y. Lin. 2002. Rice biotech research at the Taiwan Agriculture Research Institute. Asia Pacific Biotech 6:950–956. doi:10.1142/S0219030302001969

Wu, G. Q., N. Liang, R. J. Feng, and J. J. Zhang. 2013. Evaluation of salinity tolerance in seedlings of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars using proline, soluble sugars and cation accumulation criteria. Acta Physiol. Plant. 35:2665–2674. doi:10.1007/s11738-013-1298-6

Wu, Y. P. 2013. Drought tolerant rice lines by screen-

ing an ‘IR64’ mutant stock. J. Taiwan Agric. Res. 62:195–208. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2013.06203.01

Yu, Y., T. Xu, X. Li, J. Tang, D. Ma, Z. Li, and J. Sun. 2016. NaCl-induced changes of ion homeostasis and nitrogen metabolism in two sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars exhibit different salt tolerance at adventitious root stage. Environ. Exp. Bot. 129:23–36. doi:10.1016/j.envexpbot.2015.12.006

Zair, I., A. Chlyah, K. Sabounji, M. Tittahsen, and H. Chlyah. 2003. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 73:237–244. doi:10.1023/A:1023014328638

Zaman, M., S. A. Shahid, and L. Heng. 2018. Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques. Springer. Berlin, Germany. 164 pp. doi:10.1007/978-3-319-96190-3

Zeng, L., M. C. Shannon, and C. M. Grieve. 2002. Evaluation of salt tolerance in rice genotypes by multiple agronomic parameters. Euphytica 127:235–245. doi:10.1023/A:1020262932277

The Study of Salt Tolerance in Sweet Potato Mutants

Po-Hsien Lu[1,*], Ting-Zhu Zhan[2], and Yung-Chang Lai[3]

Abstract

Lu, P. H., T. Z. Zhan, and Y. C. Lai. 2020. The study of salt tolerance in sweet potato mutants. J. Taiwan Agric. Res. 69(4):298–311.

In this study, the mutants (P, 13, 17, 87, 89), 'TN57' and 'Hong Xin Wei' of sweet potato (*Ipomoea batatas*) were used as experimental materials. The salt stress was conducted in three aspects: tissue culture, potted trial and field experiment. The physiological and phenotype responses of sweet potato under salt stress were analyzed to evaluate the salt tolerance of the mutants. The results showed that different mutants responded differently to salt stress, and their salt tolerance index (STI) varied with different traits and decreased with increasing salt concentrations. The seedlings of tissue culture for mutants performed stably at 0.5% and was significantly inhibited at 1.0% salt concentration. Among them, the root length of No. 13 and No. 89 of mutants performed best. In addition, the results of the potted experiment showed that the root weight of sweet potato was stable under 150 mM salt stress, and the STI of the mutagenic line, No. 87, was the highest. It was worth noting that under 150 mM salt stress, sweet potato accumulated large amounts of Na^+ and maltose content in the roots, which might be the reason to explain why the mutants had strong salt tolerance. Further evaluation in the results of the field experiment showed that the salt stress had a slight negative impact on the shoots of sweet potato, but had larger negative effect on the roots, and it caused to the decreasing of yield for sweet potato. However, the degree of yield reduction varied with different genotypes. Among them, 'Hong Xin Wei', P and No. 87 were significantly higher. In the potted trial and the saline soil field experiment, the sweet potato mutant P and No. 87 could grow normally and had higher yields throughout the whole cultivation period. It indicated that the two lines had higher salt tolerance and could be used as the experimental materials of salt-tolerance in the breeding program of sweet potato.

Key words: Sweet potato, Salt tolerance, Mutant line.

Received: August 7, 2020; Accepted: September 28, 2020.

[*] Corresponding author, e-mail: hsien0823@dns.caes.gov.tw

[1] Assistant Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[2] Assistant Research Fellow, Crop Improvement Section, Taichung District Agricultural Research and Extension Station, Changhua County, Taiwan, ROC.

[3] Research Fellow and Head, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(4):312–325 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202012_69(4).0005

研究報告

穀胱甘肽對孤挺花組培苗瓶內增殖與瓶外生長之影響

陳威臣[1] 曹進義[1] 吳姿穎[2] 夏奇鈮[3,*]

摘要

陳威臣、曹進義、吳姿穎、夏奇鈮。2020。穀胱甘肽對孤挺花組培苗瓶內增殖與瓶外生長之影響。台灣農業研究 69(4):312–325。

本研究以孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.)「紅獅」(‘Red Lion’) 與「千禧之星」(‘Blossom Peacock’) 組培鱗莖與出瓶苗為材料，探討穀胱甘肽 (glutathione) 對組培苗瓶內增殖與瓶外生長之影響。利用「紅獅」1/4 組培鱗莖於含有不同濃度之還原態穀胱甘肽 (reduced glutathione; GSH) 或氧化態穀胱甘肽 (oxidized glutathione; GSSG) 之液態培養基中，於 10 μmol m^{-2} s^{-1} 低照光環境下振盪處理 1 h 或 2 h，再將培植體接續培養於含有 3% 蔗糖、1.0 mg L^{-1} 苯甲基腺嘌呤 (benzylaminopurine; BA) 與 0.1 mg L^{-1} 萘乙酸 (α-naphthalene acetic acid; NAA) 之 MS 固態培養基中，培養於 38 μmol m^{-2} s^{-1} 照光環境下進行試驗。結果顯示，以 65.00 μM GSH 溶液振盪處理 2 h，再於照光環境下培養 12 wk 後，每個鱗莖可得 14.7 苗為最多。將「千禧之星」1/4 組培鱗莖培養於含有不同濃度 GSH 或 GSSG 液態培養基中，於 10 μmol m^{-2} s^{-1} 低照光環境下進行振盪培養試驗，結果顯示 65.00 μM GSH 4 wk 培養有助於提高組培苗之增殖效率；延長培養至 8 wk 時，則 GSH 與 GSSG 處理組與對照組之間並無顯著差異；再延長培養至 12 wk 時，則以 16.25 μM GSSG 處理組每個組培鱗莖可誘得 8.7 苗，顯著高於對照組。以鱗莖直徑約 12 mm 或 8 mm 之「紅獅」出瓶苗於溫室栽培，並於第 9 週開始噴施不同濃度穀胱甘肽溶液，而後每 4 週噴施一次，共處理 5 次。停止噴施 7 wk 後，調查植株生長情形。結果顯示大苗鱗莖方面，僅 162.80 μM GSSG 處理組之葉片鮮重與全株鮮重顯著高於對照組；在小苗鱗莖方面，則以 162.80 μM 與 325.70 μM GSSG 處理組之全株鮮重顯著高於對照組。綜合上述結果顯示，「紅獅」培植體以 65.00 μM GSH 溶液搭配 2 h 振盪處理，可獲得最高之瓶苗增殖率。「紅獅」組培苗於出瓶 8 wk 後，每 4 週噴施一次 162.80 μM GSSG 溶液，總計噴施處理 5 次後，可增大鱗莖直徑與提高植株鮮重。

關鍵詞：華冑蘭、氧化態穀胱甘肽、還原態穀胱甘肽、光照處理、馴化。

前言

孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.) 為石蒜科 (Amaryllidaceae) 多年生鱗皮鱗莖花卉，別稱百支蓮、華冑蘭及喇叭花；栽培品種具有多樣化之花型與花色，其花朵碩大且色彩豔麗，廣泛應用於盆花、切花及花壇植物 (De Bruyn 1997; Chen & Wang 2000; Liu *et al.* 2005; Sultana *et al.* 2010)。近年來，台灣公民營單位陸續推出孤挺花新品種，但在推廣初期常面臨種苗不敷供應之困境。植物組織培養技術具有高繁殖倍率之優點，是快速量化孤挺花新品種種苗的有效方法 (Siddique *et al.* 2007; Shao & Shi 2008; Sultana *et al.* 2010; Chen *et al.* 2017)。Chen *et al.* (2017) 以孤挺花「紅獅」(*H. hybridum* ‘Red Lion’)、「千禧之星」(‘Blossom Peacock’) 及「台農 1 號」(‘Tainung No.1’) 之鱗莖為材料，成功建立其組培繁殖方式。並利用添加多效唑 (paclobutrazol; PBZ)、添加蔗糖與活性炭及

投稿日期：2020 年 4 月 7 日。接受日期：2020 年 9 月 29 日。
* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。
3 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

液態培養等方式，促進組培鱗莖之生長，然而在組培苗增殖與鱗莖養成效率上仍有改善空間 (Chen *et al.* 2018; Chen *et al.* 2019)。前人研究指出，孤挺花組培苗在量化過程中，培植體容易出現玻璃質化與褐化現象亦有待克服 (De Bruyn 1997; Chen & Wang 2000; Chen *et al.* 2018)。

植物培植體在組織培養繁殖過程中受到遺傳與環境因子的影響，常出現細胞頑抗化 (recalcitrance)、玻璃質化 (hyperhydricity) 及體細胞變異 (somaclonal variation) 等現象，阻礙培植體之生長、分化或增殖，推測係因培養基或培養環境之逆境所造成 (Cassells & Curry 2001; Şen 2012)。Nomura *et al.* (1998) 指出，植物細胞在培養過程係處於氧化逆境狀態，導致細胞生長與增殖受抑制，若能增加細胞對逆境的抗性，可減少上述生理障礙，進而提升細胞分化與增殖能力。榖胱甘肽 (glutathione) 是維持細胞氧化還原平衡的重要物質，其抗氧化能力具有緩解極端溫度或重金屬離子對植物造成之傷害 (Cassells & Curry 2001; Yeung *et al.* 2005; Tyburski & Tretyn 2010; Şen 2012; Yan *et al.* 2013)。據此推論，施用 GSH 應該有助於細胞維持於還原狀態，進而降低氧化逆境對植物造成的傷害。

過去研究指出，施用 GSH 可有效降低蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.) 組培苗、蘋果 (*Malus pumila*) 及開心果 (*Pistacia* vera) 莖頂培植體之褐化率，同時促進蝴蝶蘭、蘋果及開心果組培苗之生長與增殖 (Nomura *et al.* 1998; Liu *et al.* 2005; Tabiyeh *et al.* 2006)。施用 GSH 具有增加菸草 (*Nicotiana tabacum*) 組培苗鮮重的效果 (Son *et al.* 2014)。過去研究均以施用還原態榖胱甘肽 (reduced glutathione; GSH) 居多，而在氧化態榖胱甘肽 (oxidized glutathione; GSSG) 的研究則相對較少。本研究以不同濃度之 GSH 或 GSSG 溶液處理孤挺花組培鱗莖培植體，或添加於培養基進行共培養，探討榖胱甘肽對組培苗生長與增殖的影響。此外，利用不同濃度之 GSH 或 GSSG 溶液噴施溫室栽培的出瓶苗，探討榖胱甘肽對出瓶苗生長之影響，期能開發提升組培苗繁殖與生長效率之方法，進而加速新品種之上市與推廣。

材料與方法

材料來源、培養基配製及培養條件

本研究利用孤挺花「紅獅」 (‘Red Lion’) 與「千禧之星」 (‘Blossom Peacock’) 組培苗為材料。培養基配製與組培苗繁殖方法參閱 Chen *et al.* (2017)、Chen *et al.* (2018)、Chen *et al.* (2019)。榖胱甘肽具有還原態 (GSH) 及氧化態 (GSSG) 兩種型態，均由台灣鐘化股份有限公司 (台灣台北市) 提供。由於 2 個 GSH 可經由榖胱甘肽氧化酵素 (glutathione peroxidase; GSH-Px) 氧化成 GSSG，而 GSSG 則透過榖胱甘肽還原酵素 (glutathione reductase; GSH-Rx) 還原成 2 個 GSH。因此，本研究中 GSH 處理濃度係以 GSSG 處理濃度之 2 倍為其對應濃度，進行榖胱甘肽相關濃度試驗。培植體接種於含 20 mL 固態或液態培養基之 125 mL 三角瓶中，培養環境為 26℃ ± 2℃，液態培養則置於水平迴轉式振盪器 (SK-302AB，三寬有限公司，台灣台中市) 以 100 rpm 速度進行培養。

榖胱甘肽處理濃度與時間在照光或黑暗條件下對孤挺花「紅獅」組培苗增殖之影響

選取鱗莖直徑約為 7−8 mm 之「紅獅」組培苗為材料，切除葉片與根部後，將鱗莖十字縱切成 1/4 鱗莖作為培植體，榖胱甘肽溶液以 0.22 μm 微孔濾膜 (Millex®, Merck, Darmstadt, Germany) 過濾備用。將培植體接種於無菌水 (對照組)、32.50 μM、65.00 μM GSH 或 16.25 μM、32.50 μM GSSG溶液中，在 10 μmol m^{-2} s^{-1} 照光或黑暗環境下振盪培養 1 h 或 2 h，而後接續培養於含有 3% 蔗糖、1.0 mg L^{-1} 6-苯甲基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine; BA) 與 0.1 mg L^{-1} 萘乙酸 (α-naphthalene acetic acid; NAA) 之 MS (Murashige & Skoog 1962) 固態培養基，再置於 38 μmol m^{-2} s^{-1} 照光或黑暗環境下培養。培養達 8 wk 或 12 wk 後，調查每一鱗莖誘導形成之組培苗數。本試驗採 3 重複，每瓶接種 4 個 1/4 鱗莖為 1 重複。

榖胱甘肽於低照度環境下液態振盪培養對孤挺花「千禧之星」組培苗增殖之影響

利用與上述試驗相同方法以「千禧之星」

1/4 鱗莖為培植體，接種於含有 3% 蔗糖、1.0 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 液態培養基，分別添加穀胱甘肽使濃度為 32.50 µM、65.00 µM GSH 或 16.25 µM、32.50 µM GSSG。培植體於 10 µmol m^{-2} s^{-1} 低照度環境下振盪培養達 4、8 與 12 wk 後，調查具有綠葉之組培苗數。本試驗採 3 重複，每瓶接種 4 個 1/4 鱗莖為 1 重複。

穀胱甘肽對溫室栽培孤挺花「紅獅」出瓶苗生長之影響

選取直徑約 5–6 mm 鱗莖之「紅獅」組培苗為材料，切除部分葉片與根系後 (葉與根均保留約 3–5 mm) 為培植體，培植體接種於含有 6% 蔗糖、1.0 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 固態培養基中培養 12 wk 後，將出瓶苗洗淨後，先以免賴得 (Benomyl) (50% 可濕性粉劑) 1,000× 溶液浸泡 30 min，取出晾乾後再進行種植。依出瓶苗鱗莖大小分為大苗 (鱗莖直徑約 12 mm) 與小苗 (鱗莖直徑約 8 mm)，切除部分葉片與根系後 (葉片與根系分別保留 5 cm 與 3 cm)，種植於盛裝混合介質 (泥炭苔：蛭石：珍珠石 = 2：1：1；v/v/v) 之 35 孔穴盤，栽培於具有風扇與水牆之溫室環境下，第 9 週開始進行穀胱甘肽處理，分別為 0.0、162.8、325.7、651.4 µM GSH 與 0.0、81.4、162.8、325.7 µM GSSG，每 4 週噴施一次，直到第 25 週共處理 5 次，每 15 株噴施量約為 50 mL。處理結束 7 wk 後，調查鱗莖直徑與鮮重、葉重、葉數、葉長及葉寬。本試驗自 7 月開始至隔年 1 月結束，溫室環境於 7 月至 9 月利用雙層 (80% 與 60%) 黑網遮光，高低溫分別約 32℃ 與 25℃，而 10 月至隔年 1 月則為單層 60% 黑網遮光，高低溫分別約 27℃與 18℃。本試驗採用 3 重複，每重複為 5 株出瓶苗。

試驗設計和統計分析

本研究採完全逢機設計 (completely randomized design; CRD) 進行試驗。試驗所得資料經 SAS Enterprise Guide 7.1 套裝統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，若處理間差異顯著 (P < 0.05)，則以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD test) 比較各處理平均值間之差異。

結果

穀胱甘肽處理濃度與時間在照光或黑暗條件下對孤挺花「紅獅」組培苗增殖之影響

鱗莖培植體以不同形態與濃度之穀胱甘肽溶液於 10 µmol m^{-2} s^{-1} 低照光環境下，振盪處理 1 h 或 2 h 後接種於固態培養基，接續培養於 38 µmol m^{-2} s^{-1} 照光或黑暗環境下，對「紅獅」組培苗增殖影響結果如表 1 所示。照光下培養之變方分析 (ANOVA) 顯示，在培養 8 wk 後，振盪處理時間與穀胱甘肽處理對組培苗增殖分別具有顯著 (P < 0.05) 與非常顯著 (P < 0.001) 的影響，但兩者間並無顯著交感效應；而在培養 12 wk 後，振盪處理時間與穀胱甘肽處理對組培苗增殖分別具有極顯著 (P < 0.01) 與非常顯著的影響，且兩者間具有極顯著交感效應。組培苗增殖結果顯示，照光培養 8 wk 後，65.00 µM GSH 與 32.50 µM GSSG 振盪 2 h 處理組可得最高之 12.3 苗，但和 32.50 µM GSSG 振盪 1 h 處理組與對照組之間並無顯著差異；而在培養 12 wk 後，仍以 65.00 µM GSH 振盪 2 h 處理組保有最高苗數為 14.7 苗，與 32.50 µM GSSG 振盪培養 2 h 處理組雖無顯著差異，但仍顯著大於其餘處理組與對照組 (表 1)。

黑暗下培養之變方分析 (ANOVA) 結果顯示，在培養 8 wk 後，振盪處理時間對組培苗增殖具有顯著的影響，而穀胱甘肽處理與兩試驗因子間交感效應均無顯著影響。培養 12 wk 後，穀胱甘肽處理對組培苗增殖並無顯著影響，但振盪處理時間與兩試驗因子間交感效應分別有非常顯著與顯著影響。組培苗增殖結果顯示，黑暗培養環境下之組培苗增殖較照光環境為差，培養 8 wk 後之苗數約在 5.7–7.3 苗之間，各處理組與對照組間並無顯著差異；培養 12 wk 後，65.0 µM GSH 振盪 1 h 處理組所得苗數達 9.7 苗，顯著高於其餘處理組與對照組，而其餘處理組與對照組間之差異均不顯著 (表 1)。

圖 1 係 1/4 鱗莖於不同濃度穀胱甘肽溶液振盪處理後於固態培養基中，分別於照光或黑暗環境下培養 8 wk 後之組培苗生長情形，顯

表 1. 穀胱甘肽處理濃度與時間在照光或黑暗條件下對孤挺花「紅獅」組培苗增殖之影響。

Table 1. Effect of glutathione and shaking time on *in vitro* proliferation of *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion' plantlets under light or dark culture condition[z].

Illumination	Shaking culture time (h)	Treatment (μM)	No. of plantlets per bulb	
			8 wk	12 wk
Light	1	Control	10.7 ± 0.3 abc[y]	12.3 ± 0.9 bcd
		GSH 32.50	8.7 ± 0.3 d	9.3 ± 0.3 f
		GSH 65.00	9.7 ± 0.9 cd	11.7 ± 0.3 cde
		GSSG 16.25	9.3 ± 0.3 cd	11.0 ± 0.2 de
		GSSG 32.50	12.0 ± 0.6 ab	12.7 ± 0.3 bc
	2	Control	10.0 ± 0.6 cd	11.7 ± 0.3 cde
		GSH 32.50	10.3 ± 0.3 bcd	11.0 ± 0.6 de
		GSH 65.00	12.3 ± 0.9 a	14.7 ± 0.8 a
		GSSG 16.25	9.3 ± 0.7 cd	10.7 ± 0.3 ef
		GSSG 32.50	12.3 ± 0.3 a	13.7 ± 0.3 ab
Source			*F*-test[x]	
Shaking culture time			*	**
Treatment			***	***
Shaking culture time × treatment			ns	**
Dark	1	Control	7.3 ± 0.3 A	7.3 ± 0.3 BC
		GSH 32.50	7.3 ± 0.9 A	8.0 ± 0.6 B
		GSH 65.00	7.3 ± 0.3 A	9.7 ± 0.7 A
		GSSG 16.25	7.0 ± 0.1 A	8.0 ± 0.1 B
		GSSG 32.50	7.3 ± 0.3 A	8.0 ± 0.2 B
	2	Control	6.7 ± 0.9 A	7.3 ± 0.3 BC
		GSH 32.50	6.7 ± 0.7 A	6.7 ± 0.9 BC
		GSH 65.00	6.0 ± 0.6 A	6.0 ± 0.6 C
		GSSG 16.25	5.7 ± 0.9 A	6.7 ± 0.2 BC
		GSSG 32.50	6.7 ± 0.3 A	6.9 ± 0.3 BC
Source			*F*-test[x]	
Shaking culture time			*	***
Treatment			ns	ns
Shaking culture time × treatment			ns	*

[z] One-quarter bulb explants were shaking cultured in autoclaved water (control), reduced glutathione (GSH) or oxidized glutathione (GSSG) solution for 1 h or 2 h before inoculated on a MS (Murashige & Skoog 1962) medium containing 3% sucrose, 1.0 mg L^{-1} 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L^{-1} 1-naphthylacetic acid (NAA) under light (38 μmol m^{-2} s^{-1}) or dark condition for 8 wk and 12 wk of culture.

[y] Means of plantlets per flask with four 1/4-bulb explants in each column followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

[x] *F*-test of ANOVA. ns: non-significant; *, ** and *** are significant at 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.

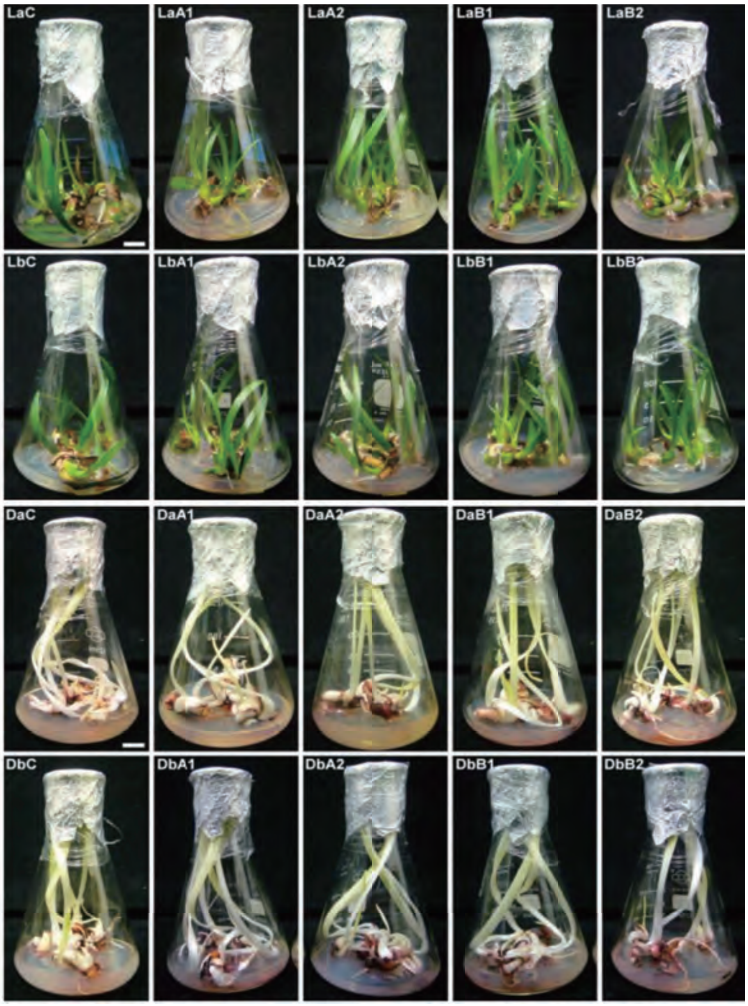


圖 1. 孤挺花「紅獅」1/4 組培鱗莖培植體經不同濃度之穀胱甘肽溶液浸泡後，培養於照光或黑暗環境下之組培苗增殖與生長情形。將培植體經無菌水 (C)、32.50 μM 或 65.00 μM GSH (A1、A2) 及 16.25 μM 或 32.50 μM GSSG (B1、B2) 浸泡 1 h (a) 或 2 h (b) 後，接種於含有 3% 蔗糖、1.0 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 固態培養基，置於照光 (38 μmol m^{-2} s^{-1}) (L) 或黑暗 (D) 環境下培養 8 wk 後，組培苗之增殖與生長情形。Bar = 1 cm。

Fig. 1. Proliferation and growth of *in vitro Hippeastrum hybridum* 'Red Lion' plantlets. One-quarter bulb was immersed in 32.50 μM and 65.00 μM reduced glutathione (GSH) (A1, A2), 16.25 μM and 32.50 μM oxidized glutathione (GSSG) (B1, B2) or autoclaved water (C) for 1 h (a) or 2 h (b), before inoculated on a MS (Murashige & Skoog 1962) medium containing 3% sucrose, 1.0 mg L^{-1} 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L^{-1} 1-naphthylacetic acid (NAA) under light (38 μmol m^{-2} s^{-1}) (L) or dark (D) condition for 8 wk of culture. Bar = 1 cm.

示照光處理可形成綠色苗，培植體與培養基褐化情形並不明顯；而黑暗處理則形成白化苗，且莖基部之褐化現象較為明顯。

穀胱甘肽於低照度環境下液態振盪培養對孤挺花「千禧之星」組培苗增殖之影響

本試驗分別在培養 4、8 及 12 wk 後進行調查，培養 4 wk 後之結果顯示，以 65.00 μM GSH 處理每個鱗莖可得約 6.0 苗，顯著高於 32.50 μM GSSG 處理組與對照組，但與 32.50 μM GSH 和 16.25 μM GSSG 處理組之間無顯著差異。在培養 8 wk 後，65.00 μM GSH 與 16.25 μM GSSG 處理組顯著高於 32.50 μM GSSG 處理組，但是與 32.50 μM GSH 處理組

和對照組之間無顯著差異。而培養 12 wk 後，16.25 μM GSSG 處理組得約 8.7 苗為最高，雖與 65.00 μM GSH 處理組之間無顯著差異，但顯著高於其餘穀胱甘肽處理組與對照組 (表 2)。圖 2 為 10 μmol m^{-2} s^{-1} 低照度環境下，組培苗於不同濃度穀胱甘肽培養液中培養 8 wk 後之生長情形，穀胱甘肽處理組與對照組之培養液皆呈現褐化情形。

穀胱甘肽對溫室栽培孤挺花「紅獅」出瓶苗生長之影響

本試驗依據出瓶苗鱗莖大小，分為直徑約 12 mm 之大苗與直徑約 8 mm 之小苗兩組試驗材料，出瓶苗在溫室中生長至第 9 週開始噴施不同濃度之穀胱甘肽溶液，每 4 週噴施 1 次至第 25 週，共噴施 5 次，並於停止噴施 7 wk 後進行調查，結果如表 3 所示。就大苗噴施穀胱甘肽溶液之結果而言，鱗莖直徑係以 162.8 μM GSSG 處理組最高，顯著高於 651.4 μM GSH 與 81.4 μM GSSG 處理組，但與其餘處理組和對照組之間無顯著差異；鱗莖直徑生長指數 (growth index; GI) 以 162.8 μM GSSG 處理組最高，顯著高於 651.4 μM GSH 與 81.4 μM GSSG 處理組，但與其餘各處理組和對照組之間無顯著差異。鱗莖鮮重以 162.8 μM GSSG 處理組最高，顯著高於 651.4 μM GSH、81.4 μM GSSG 與 325.7 μM GSSG 處理組，但與其餘處理組和對照組之間無顯著差異。葉片鮮重以 162.8 μM GSSG 處理組顯著高於其餘處理組與對照組，而 651.4 μM GSH 處理組顯著低於對照組，其餘處理組與對照組之間則無顯著差異。全株鮮重以 162.8 μM GSSG 處理組顯著高於其餘處理組與對照組，而 651.4 μM GSH 與 81.4 μM GSSG 處理組則顯著低於對照組，其餘處理組與對照組之間無顯著差異。全株鮮重生長指數以 325.7 μM GSH 最高，顯著大於 81.4 μM GSSG 處理組，而與其餘處理組和對照組之間無顯著差異 (表 3)。

就小苗噴施 GSH 或 GSSG 溶液之結果而言，各處理組與對照組之鱗莖直徑約為 21.7–23.7 mm，生長指數則在 1.7–2.0 之間，均無顯著差異。鱗莖鮮重以 651.4 μM GSH 處理組顯著低於 162.8 μM GSH、162.8 μM GSSG 及 325.7 μM GSSG 處理組，但與其餘處理組和對照組之間無顯著差異。葉片鮮重以 325.7 μM GSSG 處理組顯著高於 325.7 μM GSH、651.4 μM GSH 及 81.4 μM GSSG 處理組，但與其餘處理組和對照組之間無顯著差異。全株鮮重以 162.8 μM 與 325.7 μM GSSG 處理組最高，與 162.8 μM GSH 處理組無顯著差異，但是顯著高於其餘處理組與對照組。全株鮮重之生長指數約在 15.5–19.4 之間，各處理組與對照組之間均無顯著差異 (表 3)。

針對穀胱甘肽處理對植株葉片生長而言，除葉片鮮重已列於表 3 外，其他如葉數、葉長及葉寬在各處理組與對照組之間的差異並不明

表 2. 穀胱甘肽於低照光環境下液態振盪培養對孤挺花「千禧之星」組培苗增殖之影響。

Table 2. Effect of glutathione on proliferation of *in vitro Hippeastrum hybridum* ‘Blossom Peacock’ plantlets in liquid medium under lower light (10 μmol m^{-2} s^{-1}) condition[z].

Treatment[y]	No. of plantlets per bulb		
	4 wk	8 wk	12 wk
Control	4.3 ± 0.3 b[x]	6.7 ± 0.3 ab	6.7 ± 0.3 bc
GSH 32.50 μM	4.7 ± 0.7 ab	6.7 ± 0.7 ab	7.0 ± 0.6 bc
GSH 65.00 μM	6.0 ± 0.2 a	7.7 ± 0.3 a	8.0 ± 0.6 ab
GSSG 16.25 μM	5.7 ± 0.7 ab	8.0 ± 0.6 a	8.7 ± 0.8 a
GSSG 32.50 μM	4.3 ± 0.3 b	5.7 ± 0.7 b	6.0 ± 0.4 c

[z] One-quarter bulb (about 7–8 mm diameter) explant was cultured on a MS (Murashige & Skoog 1962) liquid medium containing 3% sucrose, 1.0 mg L^{-1} 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L^{-1} 1-naphthylacetic acid (NAA) with 100 rpm under lower light (10 μmol m^{-2} s^{-1}) condition for 4, 8 and 12 wk of culture.

[y] GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione.

[x] Means of plantlets per flask with four 1/4-bulb explants in each column followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

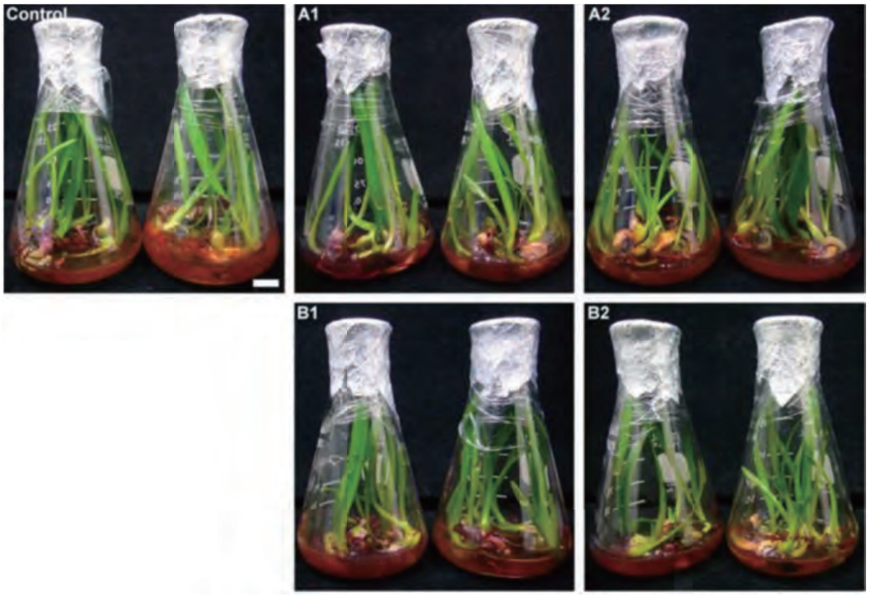


圖 2. 孤挺花「千禧之星」1/4 組培鱗莖培養於含有穀胱甘肽之液態培養基中，於低照光環境下組培苗之增殖與生長情形。將 1/4 鱗莖培養於含有 1.0 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 液態培養基 (Control)、32.50 μM、65.00 μM GSH (A1、A2) 或 16.25 μM、32.50 μM GSSG (B1、B2)，於低照光 (10 μmol m^{-2} s^{-1}) 環境下培養 8 wk 後，組培苗之增殖與生長情形。Bar = 1 cm。

Fig. 2. Proliferation and growth of *in vitro Hippeastrum hybridum* 'Blossom Peacock'. One-quarter bulb was cultured on MS (Murashige & Skoog 1962) liquid medium containing 3% sucrose, 1.0 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} 1-naphthylacetic acid (NAA) (Control), 32.50 μM and 65.00 μM reduced glutathione (GSH) (A1, A2) or 16.25 μM and 32.50 μM oxidized glutathione (GSSG) (B1, B2) under low light condition (10 μmol m^{-2} s^{-1}) for 8 wk of culture. Bar = 1 cm.

顯，葉數約 4.9–6.2 片，葉長為 42.0–49.3 cm，葉寬約 17.4–20.2 mm (資料未列)。圖 3 顯示出瓶苗經不同濃度穀胱甘肽溶液噴施處理，於溫室環境生長達 32 wk 後，其植株葉片、鱗莖大小與根系生長之結果。

討論

穀胱甘肽 (glutathione) 是植物細胞中普遍存在的一種物質，具有調節細胞氧化還原狀態的功能。植物生理和代謝過程中，GSH 與 GSSG 含量及兩者比率 (GSH/GSSG ratio) 扮演重要角色，比值較高即表示 GSH 含量較高，具有較佳抗氧化能力。近年來相當多研究結果顯示，穀胱甘肽處理可調節植物生長、發育及耐逆境反應，施用 GSH 可維持植物之正常功能並促進生長，藉以對抗非生物性逆境 (Yeung *et al.* 2005; Şen 2012; Yan *et al.* 2013; Çevik & Ünyayar 2015)。植物組織培養過程中，初代或繼代培養之切割操作，抑或培養基的物理或化學環境，對培植體均會造成氧化逆境 (oxidative stress)。培植體的氧化還原狀態對於植物器官形成、分化及再生均有所影響，多數芽體形成需要還原態環境 (reducing environment)，而體胚形成則需要氧化因子 (oxidizing factors) (Cassells & Curry 2001; Tyburski & Tretyn 2010)。

Son *et al.* (2014) 於菸草 (*Nicotiana tabacum*) 研究結果顯示，100 μM GSH 處理組與對照組之間無顯著差異，但提高濃度至 1,000 μM 時，則增加組培苗鮮重。Liu *et al.* (2005) 於蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.) 組培苗研究顯示，200 mg L^{-1} (651.4 μM) GSH 處理組具有最佳之增殖與生長促進效果，但提高濃度至 300 mg L^{-1} 時，雖培養初期具有顯著效果，但延長培養至 60 d 時，則與對照組之間無顯著差異。唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus*) 芽體再生研究結果顯示，100 μM GSH 處理組具有促進芽體形成 (shoot

表 3.　穀胱甘肽對溫室栽培孤挺花「紅獅」出瓶苗生長之影響。

Table 3. Effect of glutathione on growth of de-flask plantlets of *Hippeastrum hybridum* ‘Red Lion’ in greenhouse[z].

Bulb size	Treatment	Concentration (μM)	Diameter of bulb (mm)	Growth index[y] of diameter	Fresh weight of bulb (g)	Fresh weight of leaf (g)	Total fresh weight (g)	Growth index of total fresh weight
Large	Control	0.0	25.3 ± 0.4 abc[x]	1.10 ± 0.04 abc	14.6 ± 1.0 abc	16.8 ± 0.2 bcd	31.4 ± 1.0 bc	9.4 ± 2.0 ab
	GSH	162.8	26.0 ± 0.3 ab	1.20 ± 0.02 ab	15.8 ± 0.5 ab	17.3 ± 0.1 bc	33.1 ± 0.5 b	9.5 ± 0.8 ab
	GSH	325.7	26.1 ± 0.3 ab	1.20 ± 0.03 ab	15.0 ± 0.7 ab	18.2 ± 0.0 b	33.2 ± 0.8 b	10.6 ± 1.2 a
	GSH	651.4	24.5 ± 0.8 bc	1.00 ± 0.06 bc	12.7 ± 0.3 cd	13.7 ± 1.2 e	26.4 ± 1.3 e	8.1 ± 0.5 ab
	GSSG	81.4	23.1 ± 1.3 c	0.90 ± 0.11 c	11.9 ± 0.7 d	15.7 ± 0.4 d	27.6 ± 1.2 de	7.0 ± 0.8 b
	GSSG	162.8	27.4 ± 1.2 a	1.30 ± 0.10 a	16.3 ± 0.5 a	20.1 ± 0.2 a	36.3 ± 0.6 a	10.0 ± 0.7 ab
	GSSG	325.7	25.3 ± 0.7 abc	1.10 ± 0.06 abc	13.9 ± 0.1 bc	16.2 ± 0.1 cd	30.1 ± 0.2 cd	8.8 ± 0.6 ab
Small	Control	0.0	22.8 ± 0.7 A	1.90 ± 0.08 A	11.7 ± 0.5 AB	18.9 ± 0.5 AB	30.6 ± 0.4 BC	18.6 ± 0.9 A
	GSH	162.8	23.7 ± 0.4 A	2.00 ± 0.05 A	12.7 ± 0.2 A	18.8 ± 0.3 AB	31.4 ± 0.2 AB	16.6 ± 0.2 A
	GSH	325.7	22.6 ± 0.6 A	1.80 ± 0.07 A	11.6 ± 0.7 AB	17.1 ± 0.6 C	28.7 ± 0.8 C	19.4 ± 3.7 A
	GSH	651.4	21.7 ± 0.7 A	1.70 ± 0.09 A	10.5 ± 0.7 B	18.5 ± 0.6 B	29.0 ± 1.3 C	15.5 ± 2.7 A
	GSSG	81.4	22.8 ± 1.3 A	1.80 ± 0.17 A	11.0 ± 0.6 AB	18.6 ± 0.2 B	29.7 ± 0.6 BC	16.5 ± 1.6 A
	GSSG	162.8	23.5 ± 1.1 A	1.90 ± 0.13 A	12.6 ± 0.6 A	19.4 ± 0.2 AB	32.1 ± 0.8 A	19.1 ± 2.9 A
	GSSG	325.7	23.5 ± 0.6 A	1.90 ± 0.08 A	12.2 ± 0.3 A	20.0 ± 0.3 A	32.2 ± 0.1 A	18.7 ± 1.0 A

[z] *In vitro* rooted large (about 12 mm in bulb diameter) and small (about 8 mm in bulb diameter) plantlets of *H. hybridum* ‘Red Lion’ were planted on a mixed substrate (peat moss : vermiculite : perlite = 2 : 1 : 1, v/v/v) for 8 wk of culture, before spraying various concentrations of glutathione [0.0, 162.8, 325.7 and 651.4 μM reduced glutathione (GSH) and 0.0, 81.4, 162.8 and 325.7 μM oxidized glutathione (GSSG)] every 4 wk for a total of 5 times application. Data were collected 7 wk after the last application. Each treatment had 3 replications, 5 plants per replication and 50 mL solution was sprayed on 15 plants.

[y] Growth index = [final diameter (or fresh weight) – initial diameter (or fresh weight)]/initial diameter (or fresh weight).

[x] Means in the same column followed by different letters are significantly different at the 5% level by the least significant difference (LSD) test.

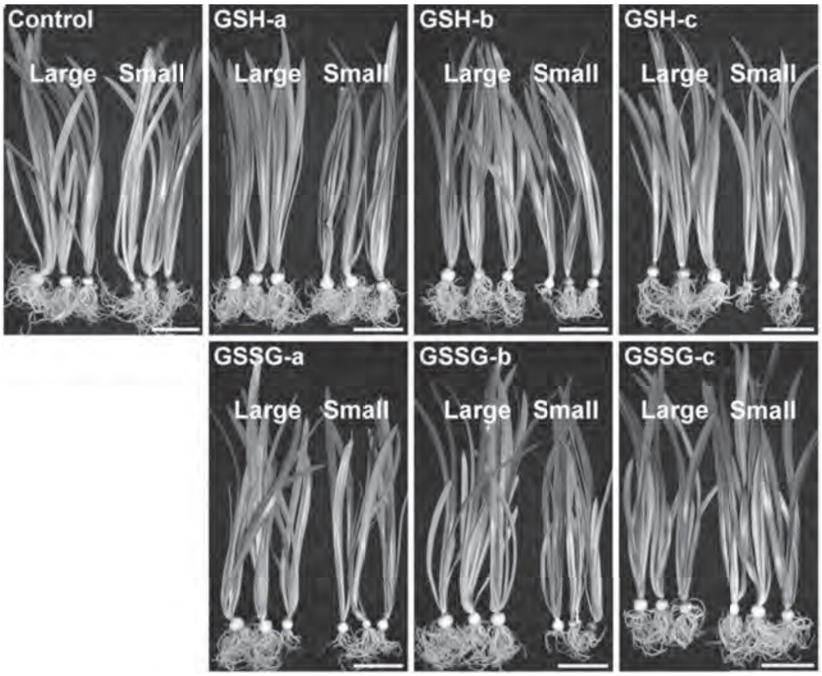


圖 3. 孤挺花「紅獅」出瓶苗於不同穀胱甘肽處理條件下，在溫室生長達 32 wk 之植株。大苗 (Large；直徑約 12 mm) 與小苗 (Small；直徑約 8 mm) 以混合介質 (泥炭苔：蛭石：珍珠石 = 2：1：1，體積比) 種植 8 wk 後開始處理，每 4 wk 噴施純水 (Control)、GSH (162.8、325.7 及 651.4 μM；GSH-a, -b, -c) 或 GSSG (81.4、162.8 及 325.7 μM；GSSG-a, -b, -c)，共噴施 5 次，停止施用 7 wk 後調查與拍照；每處理 3 重複，每重複 5 株，每 15 株噴施 50 mL 穀胱甘肽溶液。Bar = 10 cm。

Fig. 3. *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion' plants grew under various glutathione treatments for 32 wk in greenhouse condition. *In vitro* rooted large (bulb diameter about 12 mm) and small (bulb diameter about 8 mm) plantlets of *H. hybridum* 'Red Lion' were planted in a mixed substrate (peat moss : vermiculite : perlite = 2 : 1 : 1, v/v/v) for 8 wk of culture, before spraying pure water (Control), reduced glutathione (GSH) (162.8, 325.7 and 651.4 μM) (GSH-a, -b and -c), and oxidized glutathione (GSSG) (81.4, 162.8 and 325.7 μM) (GSSG-a, -b and -c) solutions every 4 wk for a total of 5 times application. Data and photos were collected 7 wk after the last application. Each treatment had 3 replications, 5 plants per replications and 50 mL glutathione solution was sprayed on 15 plants. Bar = 10 cm.

organogenesis) 效果，但提高濃度至 500 μM 或 1,000 μM GSH 時，則產生抑制結果 (Gupta & Datta 2003)。千日菊 (*Acmella oleracea*) 組培苗研究顯示，對照組在存活率、芽數及芽長均顯示高於 1–25 mg L^{-1} (3.26–81.40 μM) GSH 處理組，顯示添加 GSH 不利於芽體生長與增殖 (Shankar *et al.* 2012)。本研究利用「紅獅」1/4 鱗莖作為培植體，經穀胱甘肽處理後，分別於照光與黑暗環境進行試驗。照光培養之變方分析結果顯示，「紅獅」組培苗增殖之影響因子受到振盪處理時間與穀胱甘肽處理兩因子之影響，且振盪處理時間與穀胱甘肽處理之交感效應隨著培養時間延長而更加顯著。而在黑暗環境下培養 8 wk 時，僅振盪處理時間具有顯著影響，延長培養至 12 wk 時，振盪處理時間之影響更為顯著，其與穀胱甘肽處理之交感效應從不顯著變為顯著 (表 1)。上述結果顯示，穀胱甘肽對培植體影響之時間相當長久，這個觀點在以往研究中因為較少被長期追蹤以致往往被忽略。Foyer & Noctor (2011) 評論報告指出，GSH 參與植物光訊息傳遞 (signal transduction) 與適應強光的電生理訊息傳遞路徑，而且與光感受器訊息具有鏈結關係。此外，GSH 可藉由調控細胞生長素轉運 (auxin transportation) 和訊息傳遞等機制而達到增殖目的。本研究結果顯示，穀胱甘肽處理對培植

體之促進效果，在照光環境較黑暗環境具有較顯著之影響。

本研究瓶內試驗穀胱甘肽使用濃度為16.25–65.00 μM之間，在38 μmol m^{-2} s^{-1}照光環境下培養12 wk後，65.00 μM GSH處理具有促進「紅獅」組培苗增殖之效果。在10 μmol m^{-2} s^{-1}低照度環境下培養，「千禧之星」組培苗在4 wk短期培養時之增殖效果，亦以65.00 μM GSH處理為佳，但延長培養至12 wk時則以16.25 μM GSSG處理最佳。上述結果顯示，在不同培養環境與時間條件下，穀胱甘肽對促進組培苗增殖之最佳型態與濃度並不相同，推測不同型態穀胱甘肽在植物體內經過較長時間的轉換後，其作用可能具有不同表現，因此其型態與濃度處理效果的長效性值得進一步探討。此外，固態培養之「紅獅」試驗在38 μmol m^{-2} s^{-1}照光環境培養8–12 wk時，其組培苗增加率在7–21%之間 (表1)，顯示可延長其繼代培養期間至12 wk。而液態培養之「千禧之星」試驗於10 μmol m^{-2} s^{-1}低照度環境培養8–12 wk時，組培苗增加率僅0–9%，而且若就每週之芽體增殖率而言，培養達4 wk時約為1.1–1.5，而在8 wk培養後降為0.7–1.0，培養達12 wk後僅為0.5–0.7 (表2)。此外，在低照度環境下液態培養4 wk時之芽體增殖率最高，而培養8 wk後之培植體與培養液均出現嚴重褐化現象 (圖2)，因此建議其繼代培養期間以4–8 wk之間為宜。

Nomura *et al.* (1998) 以蘋果 (*Malus pumila*) M26品系為材料，以100 μM GSH溶液浸泡莖頂，再培養於不含GSH之培養基，不僅可抑制培植體褐化現象，並促進其生長與增重。但若接續培養於含GSH之培養基中，則造成基部癒合組織大量生長，且無法促進芽體生長。開心果 (*Pistacia vera*) 研究結果顯示，莖頂因切割導致嚴重褐化而死亡，但以100 μM GSH溶液浸泡後再培養於增殖培養基，可促進其生長與增重。同時伴隨酚類化合物的減少，以及苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonialyase; PAL) 與過氧化酶 (peroxidase; POD) 活性之降低，亦即GSH處理可提升莖頂之抗氧化能力 (Tabiyeh *et al.* 2006)。Liu *et al.* (2005) 於蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.) 研究顯示，添加GSH於培養基中不僅可抑制組培苗褐化現象，並促進其增殖與生長。本研究穀胱甘肽處理在38 μmol m^{-2} s^{-1}照光環境下，培植體褐化現象並不明顯，但黑暗固態培養環境或10 μmol m^{-2} s^{-1}低照度液態培養環境下，則可見明顯褐化現象 (圖1–2)。亦即穀胱甘肽處理對於抑制培植體褐化之效果，在黑暗或低照光培養環境下之效果並不明顯，但特定濃度如16.25 μM GSSG處理組仍有顯著高於對照組之增殖倍率 (表2)。

Baťková *et al.* (2008) 指出，組培苗在瓶內階段與出瓶馴化過程中，面對不同逆境的考驗，包括水分逆境與光抑制現象，導致活性氧族 (reactive oxygen species; ROS) 大量形成與抗氧化酵素 (antioxidative enzymes) 逐漸增加，顯示組培苗在此期間遭受嚴重的氧化逆境 (oxidative stress) 傷害。Yan *et al.* (2013) 評論報告指出，GSH是植物體內重要抗氧化物質，具有清除活性氧自由基、減輕膜損傷與脂質過氧化，以及緩解極端溫度、乾旱、重金屬及鹽分等逆境傷害。Çevik & Ünyayar (2015) 於鷹嘴豆 (*Cicer* spp.) 研究結果顯示，葉片噴施GSH可提高 *Cicer arietinum* 之GSH含量，因此較能夠耐乾旱逆境。Ding *et al.* (2016) 於胡瓜 (*Cucumis sativus*) 研究結果顯示，250 μM GSH噴施處理可促進種子苗之株高、鮮乾重及光合作用。小麥 (*Triticum aestivum*) 研究結果顯示，利用50 ppm或100 ppm (162.8 μM或325.6 μM) GSH溶液噴施葉面，可增加營養生長期 (vegetative stage) 與生殖生長期 (heading stage) 之鮮重、乾重及產量 (El-Awadi *et al.* 2014)。金盞花 (*Calendula officinalis*) 研究結果顯示，利用50、100或150 mg L^{-1} (162.8、325.6或488.5 μM) GSH溶液噴施50日齡種子苗後，對株高、分枝數及葉重均有顯著提高的效果，且濃度越高的效果越大 (Mahgoub *et al.* 2006)。Lai *et al.* (2016) 於文心蘭 (*Oncidesa* Gower Ramsey 'Honey Angel') 研究結果顯示，以5 mM GSH溶液澆灌處理可顯著促進植株之營養生長，達到提早開花與增進品質的效果，但是10 mM GSH處理組與對照組之間則無顯著差異。Wang *et al.* (2011) 於大麥 (*Hordeum vulgare*) 幼苗水耕試驗結果則顯

示，施用 GSH 對其乾重增加無顯著效果。本研究「紅獅」大苗試驗結果顯示，對照組鱗莖直徑和鮮重與部分穀胱甘肽處理組之間無顯著差異，甚至高於部分處理組；僅有 162.8 μM GSSG 處理組之葉片與全株鮮重顯著高於對照組，顯示噴施穀胱甘肽只在特定濃度如 162.8 μM GSSG 處理下，才能促進出瓶苗生長；小苗試驗亦顯示同樣趨勢的結果 (表 3)。本研究之穀胱甘肽處理顯示在特定濃度處理下具有促進效果，但某些處理條件卻抑制生長，推測原因可能是受到植物體內生 (endogenesis) 抗氧化物質與酵素含量高低，造成氧化還原狀態差異所導致的結果，此問題仍有待進一步探討。

此外，本研究僅調查在穀胱甘肽停用 7 wk 後之表現，因此無法對更長久之影響進行討論。本研究中大苗對照組在經 32 wk 的溫室栽培後，鱗莖直徑、鱗莖鮮重及全株鮮重僅稍高於小苗對照組 (表 3)，主要係因小苗鱗莖直徑與全株鮮重之生長指數均大幅度高於大苗，亦即小苗生長速率較快，在栽培一段時間後，其生長量即與大苗相當 (表 3)。依據上述結果建議，組培苗鱗莖直徑若已達約 8 mm 時，即可將其移出瓶外進行栽培。

Zhu *et al*. (2005) 於孤挺花「雙紀錄」(‘Double Record’) 雙鱗片繁殖研究結果顯示，周徑約 3.6 cm (直徑約 11 mm) 之子球經 60 wk 栽培後，可得直徑約 70 mm 的子球，但其直徑介於 48–113 mm 之間。Ephrath *et al*. (2001) 以「紅獅」進行雙鱗片繁殖試驗，也顯示相同的趨勢，子球經 52 wk 栽培後，81% 子球周徑約為 10 cm (直徑約 32 mm)，但多數介於 6–8 cm (直徑約 19–25 mm) 之間，而有 19% 子球周徑大於 12 cm (直徑約 38 mm)，同樣顯示子球大小差異極大的結果。上述結果顯示，雙鱗片繁殖所得子球若以鱗莖大小分級進行試驗，常造成同一處理內之變異偏高。本研究利用鱗莖直徑分別約為 12 mm 及 8 mm 之「紅獅」出瓶苗進行試驗，兩組試驗材料鱗莖直徑分別在 7.1–9.3 mm 與 10.2–13.6 mm 之間，結果顯示處理內變異較小，有效避免試驗材料所造成的誤差。依據 Ephrath *et al*. (2001) 於「紅獅」研究結果顯示，經由雙鱗片繁殖法產生的子球經 52 wk 的栽培後，所得直徑介於 19–38 mm 之間，平均約 32 mm。本研究結果顯示，「紅獅」出瓶苗經 32 wk 栽培後之鱗莖直徑約為 22–27 mm，若以單位栽培時間之生長而言，本研究之結果應與上述研究相似或更佳，顯示利用組培出瓶苗進行栽培，其生長效率並不低於慣用之雙鱗片繁殖法，而且組培苗更具有較高的種苗整齊度。

誌謝

本文稿承農業試驗所花卉研究中心蔡媚婷博士協助審閱，特此申謝。

引用文獻

Baťková, P., J. Pospíšilová, and H. Synková. 2008. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. Biol. Plant. 52:413–422. doi:10.1007/s10535-008-0085-5

Cassells, A. C. and R. F. Curry. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: Implications for micropropagators and genetic engineers. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 64:145–157. doi:10.1023/A:1010692104861

Çevik, S. and S. Ünyayar. 2015. The effects of exogenous application of ascorbate and glutathione on antioxidant system in cultivated *Cicer arietinum* and wild type *C. reticulatum* under drought stress. J. Nat. Appl. Sci. 19:91–97.

Chen, T. C. and T. Y. Wang. 2000. Effect of salt strength and sucrose concentration on bulblet growth of *Hippeastrum hybridus* Hort. *in vitro*. Hort. NCHU 25:83–94. (in Chinese with English abstract)

Chen, U. C., I. Din, T. Y. Wu, J. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2017. Effect of disinfection method, explant type, and plant growth regulator on establishment *in vitro* bulblet proliferation of Amaryllis. J. Taiwan Agric. Res. 66:286–297. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2017.06604.03

Chen, U. C., T. Y. Wu, J. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2018. Effects of two-stage culture and paclobutrazol on *in vitro* bulblet growth and rooting of *Hippeastrum hybridum*. J. Taiwan Agric. Res. 67:44–53. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201803_67(1).0005

Chen, U. C., J. Y. Tsao, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2019. Effect of explant size, sucrose and activated charcoal on *in vitro* plantlet proliferation and growth in amaryllis. J. Taiwan Agric. Res. 68:137–147.

(in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201906_68(2).0004

De Bruyn, M. H. 1997. Micropropagation of amaryllis (*Hippeastrum hybridum*). p.3–13. *in*: Biotechnology in Agriculture and Forestry 40: High-Tech and Micropropagation VI. (Bajaj, Y. P. S., ed.) Springer. New York, NY. 397 pp. doi:10.1007/978-3-662-03354-8

Ding, X., Y. Jiang, L. He, Q. Zhou, J. Yu, D. Hui, and D. Huang. 2016. Exogenous glutathione improves high root-zone temperature tolerance by modulating photosynthesis, antioxidant and osmolytes systems in cucumber seedlings. Sci. Rep. 6:35424. doi:10.1038/srep35424

EI-Awadi, M. E., S. R. EI-Lethy, and K. G. EI-Rokiek. 2014. Effect of the two antioxidants; glutathione and ascorbic acid on vegetative growth, yield and some biochemical changes in two wheat cultivars. J. Plant Sci. 2:215–221. doi:10.11648/j.jps.20140205.20

Ephrath, J. E., J. Ben-Asher, F. Baruchin, C. Alekperov, E. Dayan, and M. Silberbush. 2001. Various cutting methods for the propagation of Hippeastrum bulbs. Biotronics 30:75–83.

Foyer, C. H. and G. Noctor. 2011. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. Plant Physiol. 155:2–18. doi:10.1104/pp.110.167569

Gupta, S. D. and S. Datta. 2003. Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. Biol. Plant. 47:179–183. doi:10.1023/B:BIOP.0000022248.62869.c7

Lai, S. L., K. Ogawa, S. Ichihashi, and W. T. Tsai. 2016. Effects of glutathione on the growth and flowering of *Oncidesa* Gower Ramsey 'Honey Angel'. J. Taiwan Soc. Hort. Sci. 62:163–172. (in Chinese with English abstract)

Liu, Z., H. Ge, S. Guo, H. Liu, C. Cao, Y. Zhou, and Q. Li. 2005. Studies of antibrowning in the tissue culture of *Phalaenopsis*. Acta Hort. Sin. 32:732–734. (in Chinese with English abstract) doi:10.3321/j.issn:0513-353X.2005.04.039

Mahgoub, M. H., N. G. Abd El Aziz, and A. A. Youssef. 2006. Influence of foliar spray with paclobutrazol or glutathione on growth, flowering and chemical composition of *Calendula officinalis* L. Plant. J. Appl. Sci. Res. 2:879–883.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Nomura, K., S. Matsumoto, K. Masuda, and M. Inoue. 1998. Reduced glutathione promotes callus growth and shoot development in a shoot tip culture of apple root stock M26. Plant Cell Rep. 17:597–600. doi:10.1007/s002990050449

Şen, A. 2012. Oxidative stress studies in plant tissue culture. p.59–88. *in*: Antioxidant Enzyme (El-Missiry, M. A., ed.) IntechOpen. Rijika, Croatia. 400 pp. doi:10.5772/2895

Shankar, V., V. Thekkeettil, G. Sharma, and V. Agrawal. 2012. Alleviation of heavy metal stress in *Spilanthes calva* L. (antimalarial herb) by exogenous application of glutathione. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 48:113–119. doi:10.1007/s11627-011-9409-9

Shao, S. J. and Y. M. Shi. 2008. *In vitro* micro-propagation from *Hippeastrum*'s little aseptic bulb and its effecting factors. J. Shanghai Jiaotong Univ. (Agric. Sci.) 26:5–8. (in Chinese with English abstract) doi:10.3969/j.issn.1671-9964.2008.01.002

Siddique, M. N. A., J. Sultana, N. Sultana, and M. M. Hossain. 2007. *Ex vitro* establishment of *in vitro* produced plantlets and bulblets of Hippeastrum (*Hippeastrum hybridum*). Intl. J. Sustain. Crop Prod. 2:22–24.

Son, J. A., D. P. Narayanankutty, and K. S. Roh. 2014. Influence of exogenous application of glutathione on rubisco and rubisco activase in heavy metal-stressed tobacco plant grown *in vitro*. Saudi J. Biol. Sci. 21:89–97. doi:10.1016/j.sjbs.2013.06.002

Sultana, J., N. Sultana, M. N. A. Siddique, A. K. M. A. Islam, M. M. Hossain, and T. Hossain. 2010. *In vitro* bulb production in Hippeastrum (*Hippeastrum hybridum*). J. Cent. Eur. Agric. 11:469–474. doi:10.5513/JCEA01/11.4.867

Tabiyeh, D. T., F. Bernard, and H. Shacker. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA_3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. Acta Hortic. 726:201–204. doi:10.17660/ActaHortic.2006.726.31

Tyburski, J. and A. Tretyn. 2010. Ascorbate and glutathione in organogenesis, regeneration and differentiation in plant *in vitro* cultures. p.55–90. *in*: Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants. (Anjum, N. A., S. Umar, and M. T. Chan, eds.) Springer. Dordrecht, Nederland. 443 pp. doi:10.1007/978-90-481-9404-9

Wang, F., F. Chen, Y. Cai, G. Zhang, and F. Wu. 2011. Modulation of exogenous glutathione in ultrastructure and photosynthetic performance against Cd stress in the two barley genotypes differing in Cd tolerance. Biol. Trace. Elem. Res. 144:1275–1288. doi:10.1007/s12011-011-9121-y

Yan, H. F., P. S. Mao, and F. S. Xia. 2013. Research progress in plant antioxidant glutathione. Acta Agrestia

Sin. 21:428–434. (in Chinese with English abstract) doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2013.03.003

Yeung, E. C., M. F. Belmonte, L. T. T. Tu, and C. Stasolla. 2005. Glutathione modulation of *in vitro* development. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 41:584–590. doi:10.1079/IVP2005683

Zhu, Y., K. S. Liu, and J. C. Yiu. 2005. Effect of cutting method on bulb production of *Hippeastrum hybridum* in Taiwan. Acta Hortic. 673:531–535. doi:10.17660/ActaHortic.2005.673.71

Effect of Glutathione on *In Vitro* Proliferation and *Ex Vitro* Growth of *Hippeastrum hybridum* Plantlets

Uei-Chern Chen[1], Jhin-Yi Tsao[1], Tzu-Ying Wu[2], and Chi-Ni Hsia[3,*]

Abstract

Chen, U. C., J. Y. Tsao, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2020. Effect of glutathione on *in vitro* proliferation and *ex vitro* growth of *Hippeastrum hybridum* plantlets. J. Taiwan Agric. Res. 69(4):312–325.

Effects of glutathione on *in vitro* proliferation and *ex vitro* growth of plantlets of *Hippeastrum hybridum* Hort. ‘Red Lion’ or ‘Blossom Peacock’ were investigated in this study. One-quarter *in vitro* bulb of ‘Red Lion’ was taken as an explant treating with various concentrations of reduced (GSH) or oxidized (GSSG) glutathione for 1 h or 2 h before culturing on a MS solid medium supplemented with 3% sucrose, 1.0 mg L^{-1} benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L^{-1} α-naphthalene acetic acid (NAA) for 12 wk under 38 μmol m^{-2} s^{-1} light condition. The best proliferation rate of 14.7 plantlets per bulb was obtained by using 65.00 μM GSH solution for 2 h shaking. *In vitro* one-quarter bulb of ‘Blossom Peacock’ used as explant was cultured in a liquid medium containing various concentration of GSH or GSSG under 10 μmol m^{-2} s^{-1} light condition for various duration. Result showed that the highest proliferation rates were from 65.00 μM GSH treatment in a 4-wk-span culture and no significant difference was found among all glutathione treatments with the control after 8-wk culturing. However, prolonging culture time to 12 wk, the highest proliferation rate of 8.7 plantlets per bulb was obtained from 16.25 μM GSSG treatment. The effect of glutathione on growth was conducted using the 9-wk-old de-flask plantlets of ‘Red Lion’ in either 12 mm or 8 mm bulb diameter by spraying with various concentrations of GSH and GSSG solution every 4 wk for consecutive five times in greenhouse. Growth data of plants was collected at 7 wk after the last glutathione application. Results showed that larger plantlets (with 12 mm bulb diameter) sprayed with 162.80 μM GSSG having higher fresh weight on leaves and whole plant than that of the control. In respect of the smaller plantlets (with 8 mm bulb diameter), higher whole plant weights were found from treatments of 162.80 μM and 325.70 μM GSSG than that of the control. In conclusion, *in vitro* explants of ‘Red Lion’ treated with 65.00 μM GSH solution for 2 h were found to have the highest proliferation rate. In regard to *ex vitro* plantlet growth, the 9-wk-old de-flask plantlets of ‘Red Lion’ spraying with 162.80 μM GSSG solution at 4 wk interval for 5 times in total had the largest bulb diameter and fresh weight.

Key words: Amaryllis, Reduced glutathione, Oxidized glutathione, Illumination, Acclimation.

Received: April 7, 2020; Accepted: September 29, 2020.
* Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
2 Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
3 Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(4):326–334 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202012_69(4).0006

研究簡報

芸香種子中肉桂芸香鹼成分分析與微體繁殖系統之建立

劉克威[1,#] 孫立庭[2,#] 金立德[3,4,*]

摘要

劉克威、孫立庭、金立德。2020。芸香種子中肉桂芸香鹼成分分析與微體繁殖系統之建立。台灣農業研究 69(4):326–334。

芸香屬於無患子目 (Sapindale) 的多年生草本植物，由於其種子中含有大量吲哚生物鹼類的「肉桂芸香鹼」(harmine)，有抗癌、抗病毒、抗菌、抗發炎等等許多藥理作用。文獻雖記載自荷蘭據台治理時期即栽種芸香作為藥用植物，但因年代久遠，再加上醫藥普及，台灣已未再有芸香經濟栽培及下游產業。因此，本研究重新選拔高含量肉桂芸香鹼芸香植株，並建立組織培養繁殖方法，期望獲得穩定足量的肉桂芸香鹼供後續應用。本研究以嘉義市野外採集及市售芸香種子為材料，種子在含有 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類的固態培養基中發芽，將幼苗莖頂和子葉作為培植體，接種於含有 6-苄基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine; BAP) 的固態培養基中誘導多芽體，再將多芽體切割成單芽後培養於 1/2 MS 基本鹽類且含有吲哚丁酸 (indole-3-butyric acid; IBA) 的固態培養基中誘導根生成，最後將完整植株馴化移植出瓶定植生長。定植生長後，蒐集成株結實種子以粗製步驟萃取後，將萃取液放在紫外燈光源下初篩，最後再使用高效液相層析分析與標準品比較肉桂芸香鹼之存在與否並定量。結果顯示，使用組織培養微體繁殖方式能成功增殖出芸香植株，並從 6 個相應種子樣本中確認一株肉桂芸香鹼之產出，進而獲得每 100 g 種子肉桂芸香鹼約為 0.75 g 產量、可供未來保健產業應用之本土芸香植株。

關鍵詞：芸香、肉桂芸香鹼、組織培養、高效液相層析。

前言

《健康全書》(拉丁語：*Tacuinum sanitatis*) 是一部歐洲中世紀改編自 11 世紀阿拉伯文的「保持健康」手冊之著作，書籍以拉丁文寫成，圖文並茂。插圖位於頁面上方，描繪有維持健康所需的動植物、礦物、器具等 (Daunay *et al*. 2009)，其中即記載芸香 (*Ruta graveolens* L.) 有明眼去脹氣之功能，天主教神父甚至以芸香枝為施灑聖水之用，加強去邪功能。芸香於荷蘭據台治理時期即是台灣重要藥用植物 (Wu 1993a)，具有清熱解毒、促進血液循環、殺蟲殺菌及抗發炎等作用。現今已知芸香具有上述多重生物活性之主要原因，可能在於其種子與植株中含有 β-carboline 類的生物鹼 ── 肉桂芸香鹼 (harmine) (Rayburn 2007) 有關。

肉桂芸香鹼具有抗菌、抑制血小板凝集、血管舒張、降血壓、降血糖、抗憂鬱及抗發炎等不同的藥理效果 (Patel *et al*. 2012)；此外，體外研究也證實單獨使用肉桂芸香鹼有抑制乳癌 (Zhao & Wink 2013; Tehrani *et al*. 2014)、甲狀腺癌 (Ruan *et al*. 2017)、胃癌 (Li *et al*. 2017)、神經膠質母細胞瘤 (Liu *et al*. 2013) 及肝癌 (Zhang *et al*. 2015) 等細胞株之增殖作用，具

投稿日期：2020 年 3 月 24 日；接受日期：2020 年 8 月 19 日。
[*] 通訊作者：litechin@mail.ncyu.edu.tw
[#] 對本文貢獻相同。
[1] 國立嘉義大學微生物免疫與生物藥學系暨研究所研究生。台灣 嘉義市。
[2] 國立嘉義大學微生物免疫與生物藥學系暨研究所免疫藥理研究室兼任研究員。台灣 嘉義市。
[3] 國立嘉義大學微生物免疫與生物藥學系暨研究所副教授。台灣 嘉義市。
[4] 國防醫學院醫學科學研究所兼任副教授。台灣 台北市。

體效果機制可能與抑制癌細胞內端粒酶 (telomerase) (Zhao & Wink 2013)、週期蛋白依賴性激酶 (cyclin-dependent kinase) (Song *et al*. 2004) 或 Akt 訊息傳導路徑 (Liu *et al*. 2013) 等有關。另當病毒感染時，宿主細胞內高度表現的第 1A 型雙特異性酪氨酸磷酸化調節激酶 (dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A; DYRK1A)，可以大幅穩定病毒蛋白，使細胞中病毒相關蛋白質維持高含量，進而增加病毒在宿主體內擴散的潛在可能性；利用結構生物學的方法，解析出肉桂芸香鹼乃 DYRK1A 的專一抑制劑 (Göckler *et al*. 2009)。進一步研究發現，無論是巨細胞病毒 (cytomegalovirus; CMV)、水痘病毒 (varicella-zoster virus; VZV) 甚至是第一型單純皰疹病毒 (herpes simplex virus type 1; HSV-1) 之體外複製，皆可利用肉桂芸香鹼來大幅降低 (Hutterer *et al*. 2017)。專一抑制宿主細胞的 DYRK1A，這種機制應與先前報導肉桂芸香鹼亦有抑制披膜病毒 (togavirus) (Hudson *et al*. 1986)、第二型單純皰疹病毒 (herpes simplex virus type 2; HSV-2) (Benzekri *et al*. 2018) 及腸病毒 71 型 (enterovirus 71) (Chen *et al*. 2018) 感染等有相當之關聯性。

約 400 年前荷蘭人不只一次以文字方式記載芸香為台灣重要藥草 (Wu 1993a)，可見在荷蘭勢力廣布於非洲、南美洲及亞洲的年代，台灣南部芸香農產業不僅發展很早，且已發揮到了高峰。但隨著明清、日據時代及政府遷台後分別改以糧食作物和糖、米、雜糧、果實及蔬菜類等經濟作物為主要農業方向，如芸香等中草藥栽種即逐漸被忽視 (Wu 1993b)。反觀國際上已利用肉桂芸香鹼之特殊性質，開發諸如抗登革熱病毒 (Quintana *et al*. 2016) 藥物及抗癌 (Carvalho *et al*. 2017) 藥物進入現代化新藥市場，台灣芸香產業卻仍受限於園藝觀賞用途。

近年來以預防疾病的發生來代替對疾病治療之「預防醫學」觀念大為興起，芸香有千年以上的保健食用歷史，故對於人體應用安全性有相當大的保障，可算是具有療癒力的「活食物」。肉桂芸香鹼的作用並不專一針對個別病源，反而藉影響人體細胞而達其效果，這又與中醫「上醫治未病」的境界相呼應。本研究以採集嘉義市蘭潭 (舊稱「紅毛埤」；本為荷蘭據台治理時期，荷人築堰為埤形成，截入八掌溪溪水用以灌溉附近一帶的田園) 周邊地區及市售之芸香種子，利用組織培養的方法繁殖，再藉肉桂芸香鹼在紫外線照射下會釋出藍紫色螢光之特性 (Shankaraiah *et al*. 2016)，建構高產芸香平台。期望可憑藉著芸香預防保健的豐富性而擴展實際應用的可能性，使台灣芸香產業恢復蓬勃發展生機。

材料與方法

種子來源與處理

採集嘉義市蘭潭周邊地區及農友種苗股份有限公司 (台灣高雄市) 和蔬菜工坊 (台灣台北市) 所售之芸香種子共六個樣本 (編號：a–f) 進行試驗，選擇大小、重量一致，外皮完整無皺縮的健康種子，使用 0.5% 次氯酸鈉溶液對種子進行表面滅菌，再以組織培養技術進行幼苗培育。另將市售芸香種子直接進行生物鹼之萃取；野外蒐集之芸香種子，則待微體繁殖、開花結實後，再收集大量種子進行生物鹼之萃取。

生物鹼粗萃取

以改進自 Elgubbi *et al*. (2017) 所述之方式進行肉桂芸香鹼萃取，將 100 g 種子以咖啡機磨碎後，浸泡於 3 倍重量之 30% 醋酸溶液中，以超音波振盪 15 min，然後於室溫靜置 48 h。之後將成麵團狀之混合物進行擠壓過濾，過濾後之殘留物再以 2× 重量之 30% 醋酸溶液進行超音波振盪 15 min，重複過濾過程一次。澄清液緩慢加入大量碳酸鈉 (pH 8) 同時攪拌直至溶液變渾濁，於 4℃靜置 24 h 後，吸掉上清液並收集沉澱的生物鹼。所收集之淡黃色結晶體可溶於 60℃水與 100% 醋酸 1 : 3 (v/v) 溶液中，而其中之肉桂芸香鹼會吸收 247 nm 及 322 nm 的紫外光並放出波峰為 415 nm 之藍紫色螢光 (Shankaraiah *et al*. 2016)。

芸香幼苗培育

以 MS (Murashige & Skoog 1962) 基礎培養基加上 3% (w/v) 之蔗糖作為配方，再加入

0.8% (w/v) 瓊脂之前先將培養基 pH 值調至 5.8。將配好的培養基放入高壓滅菌釜中滅菌後，每個培養平盤平均倒入 30 mL 培養基，靜置冷卻 12–18 h。種子用 0.5% 次氯酸鈉溶液將表面滅菌後進行固態培養，置於 26℃、42 μmol m^{-2} s^{-1} 光照 16 h 培養進行無菌萌發。

多芽體誘導和生根

以 10 d 大的幼苗切下莖頂及子葉 (0.5 cm) 作為培植體，根據 Goel *et al*. (2009) 之報導，將培植體培養在添加 4.44 μM 6-benzylamino-purine (BAP) 的 MS 培養基上其芽體再生率最高。因此，本研究使用 MS 基礎培養基加上 3% (w/v) 蔗糖以及 1 mg L^{-1} (4.44 μM) BAP 作為配方，將 pH 值調至 5.8 後再加入 0.8% (w/v) 瓊脂。將配好的培養基滅菌後，每個蘭花培養瓶平均倒入 150 mL 培養基，靜置冷卻 12–18 h。將培植體進行固態培養，置於 26℃、42 μmol m^{-2} s^{-1} 光照 16 h 進行多芽體誘導。之後分別切下在培養基中形成細長的多枝芽，並在無菌條件下植入含有 5.0 μM indole-3-butyric acid (IBA) 的 1/2 MS 培養基 (半強度鹽和 3% 蔗糖) 的培養管中生根。將完整的小植株用自來水中沖洗，洗去根部培養基，然後移植到裝有滅菌的泥炭培養土和珍珠石 1：1 混合物的花盆中。花盆上蓋有一個開小孔的聚乙烯袋，用以保持高濕度，放在培養箱中 15 d，每天將聚乙烯袋移開約 3–4 h，使植物暴露於自然濕度下。經過一個星期後，將植物移植至裝有泥炭培養土和珍珠石比例 1：3 的大塑膠盒中，並保持在自然條件下，待其開花結實。

生物鹼高效液相層析分析

將粗萃取之生物鹼配合使用 Dionex® ASI-100 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 自動樣品分注進樣器 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 及 Dionex® P580 泵浦 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 通過 5 毫米逆相 Supelco® C18 管柱 (250.0 mm × 4.6 mm; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 以進行梯度溶析，同時以 Dionex® PDA-100 光電二極管陣列可變 UV/Vis 檢測器 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 測量 247 nm 的紫外線吸光度。進行高效液相層析分析所使用之肉桂芸香鹼和氫化肉桂芸香鹼的標準品購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)，流動相由雙次蒸餾水 (溶液 A) 和甲醇 (溶液 B) 組成。所有分離步驟均採取多步梯度 (multi-step gradient)；初始進樣量為 15 μL，流速為 1 mL min^{-1}。多步梯度條件如下：0–5 min 5.0% B，5–10 min 20.0% B，15–20 min 20.0% B，20–40 min 80.0% B，40–60 min 100.0% B，60–70 min 100.0% B，70–80 min 5.0% B。收集液相層析洗脫液，並在紫外燈下檢查螢光。

結果

芸香微體繁殖

將表面滅菌、特徵一致之芸香種子 (圖 1A，由左至右：農友種苗、蔬菜工坊、校園採集、環潭道路、水壩邊坡、紀念公園) 培養於 MS 基礎培養基上，經過 10 d 後顯示出大約70% 以上的發芽率 (圖 1B–1G) 且生長良好，故用來生產大量繁殖用的培植體。添加細胞分裂素可以在體外誘導枝芽的再生，本研究使用 BAP 來誘導芸香培植體枝芽的再生，結果證實使用 1 mg L^{-1} (4.44 μM) 的使用量可以有效的誘導所有6種收集樣本再生出培植體枝芽 (圖 2)，因種子健康程度一致，故均有超過 90% 的誘導率。切下形成的細長多芽後，種於添加蔗糖以及 IBA 的 1/2 MS 培養基中可以有效的再生根部，其再生發根的平均效率約 80%、6 種樣本間無顯著之差異。將生根的芽苗先使用自來水沖洗根部培養基後，種植在已滅菌的泥炭培養土壤和珍珠石混合物比例為 1：1 的花盆中。在花盆外蓋上開一個孔洞的聚乙烯袋以保持濕度 15 d，並且每天將花盆放於自然條件下 3–4 h，以使幼苗適應環境。1 wk 後，將植物轉移至自然環境中正常生長 (圖 2)，存活率可達 90% (圖 2)。不同收集系的芽體誘導率、發根率以及出瓶後的存活率，並無統計上的顯著差異。

生物鹼萃取、螢光測試與高效液相層析

肉桂芸香鹼可藉吸收紫外線而產生增色

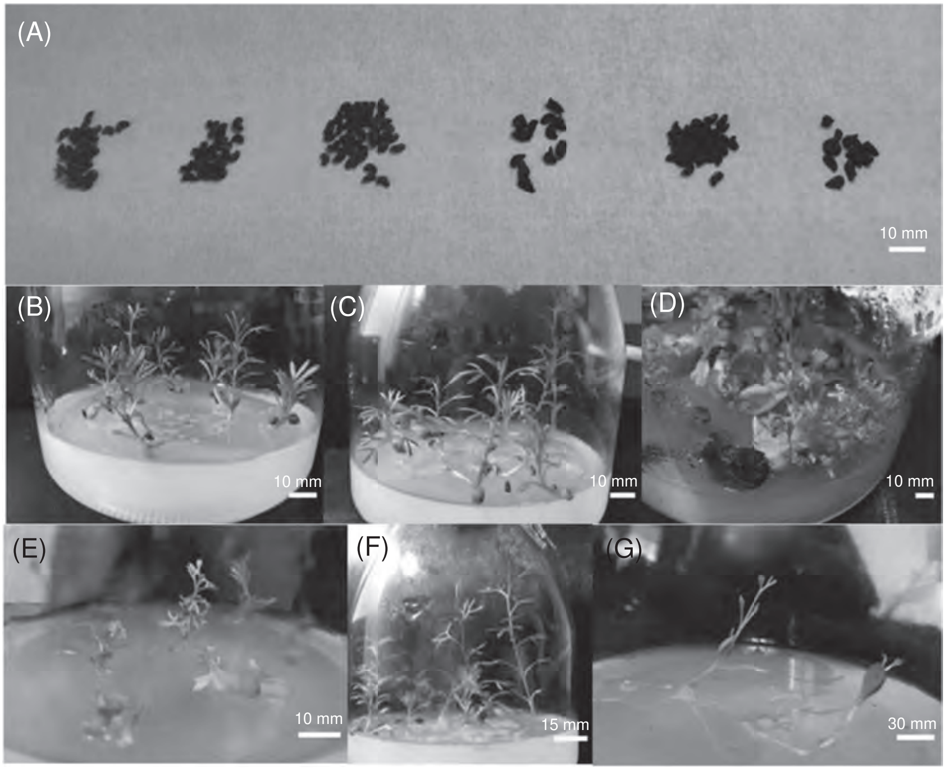


圖 1. (A) 本研究所使用之蒐集芸香種子外觀圖；由左至右分別對應植株 (B–G) 外觀圖。

Fig. 1. (A) The appearance of collected rue seeds and (B–G) the respective shoots.

(hyperchromicity) 效應，肉桂芸香鹼的大約含量可以透過追蹤紫外線的增色性來分析；在暗箱紫外線照射下，所有種子樣本皆未偵測到螢光，但當樣本 d (環潭道路) 之種子萃取液在冷凍乾燥後產生明顯的紫藍色螢光 (圖 3A)。此外，多芽體、莖、葉或花也沒有偵測到螢光發出。而 100 g 樣本 d 種子之萃取液置於紫外線照射中時，其亦會誘導螢光產生 (圖 3B)，由於螢光為採樣種子中樣本 d 萃取液所特別產出的，顯示樣本 d 含有 6 個樣本中最高濃度之肉桂芸香鹼。圖 4 顯示，使用本研究收集之樣品與開發的萃取條件，在高效液相層析分析下可見樣本 d 之種子萃取液中含有肉桂芸香鹼 (retention time 44–48 min) 和氫化肉桂芸香鹼 (harmaline; retention time 42–44 min)。樣本 d 之肉桂芸香鹼產量，每 100 g 種子約為 0.75 g。此外，如色譜圖所示，萃取液所含肉桂芸香鹼和氫化肉桂芸香鹼量之比值約為 6 : 4。

討論與結論

肉桂芸香鹼是一種具有許多藥理特性的生物鹼，因此民間有使用芸香作為調味品及有解毒功效的夏季清涼飲品。惟採集野生芸香，因植株不僅肉桂芸香鹼含量不一，且汁液含有檸檬油、桉油精及香豆素等可致敏成分，不慎觸碰後易導致嚴重的接觸性皮膚炎。故篩選高肉桂芸香鹼含量的芸香品種，並萃取肉桂芸香鹼，對實際民俗應用及相關產品後續研發甚至於開發小分子藥物上等皆極具關鍵性。

台灣有許多特有原生植物，惜受到不同等級威脅而逐漸消失於野外，故利用植物繁殖復育的技術來進行相關之保種保育任務相當重要。對於具有景觀園藝或經濟作物價值的物種，我國已多有人工繁殖技術之推廣及加強栽種，不過對於芸香之相關研究卻不多見。國際上為避免異花授粉而造成基因的多變

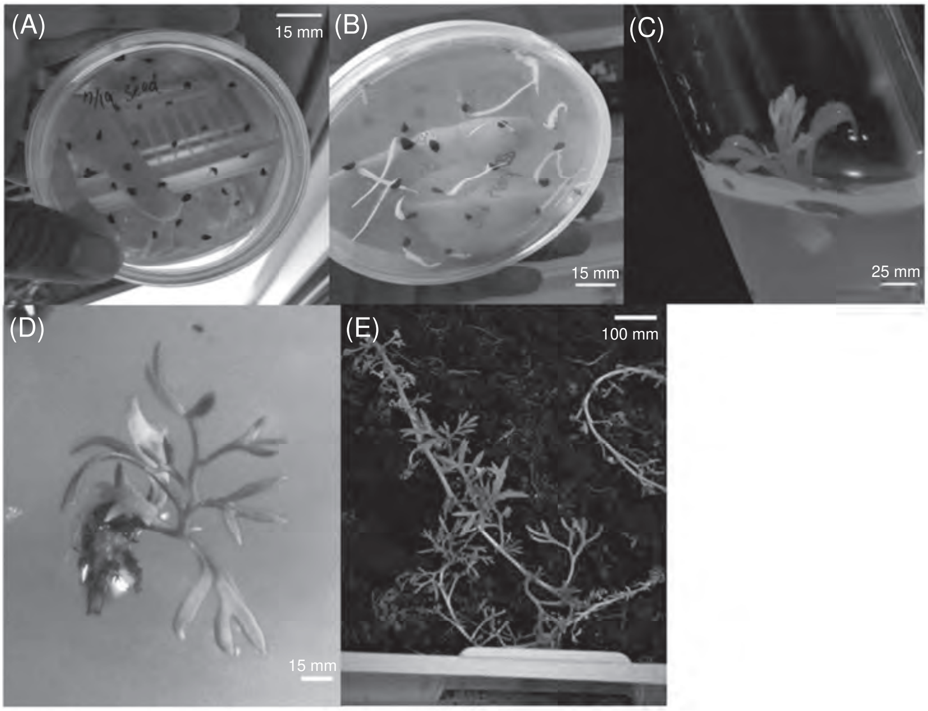


圖 2.　芸香組織培養與發育。(A) 芸香種子培養於 MS 基礎培養基上；(B) 種子發芽情形；(C) 莖尖培養在 1/2 MS + 4.44 μM BAP 上再生芽體；(D) 在含有 5.0 μM IBA 的 1/2 MS 培養基上從芽再生根；(E) 完整植株移植至大塑膠盒中。

Fig. 2.　Tissue culture and the development of the rue plants. (A) Collected seeds were grown on the MS (Murashige & Skoog 1962) basal medium; (B) germination of rue seed; (C) generation of multiple shoots from the dissected shoot apex on MS + 4.44 μM 6-benzylaminopurine (BAP); (D) regenerating roots on half strength salt medium containing 5.0 μM indole-3-butyric acid (IBA); and (E) transplantation of whole plants into big plastic boxes.

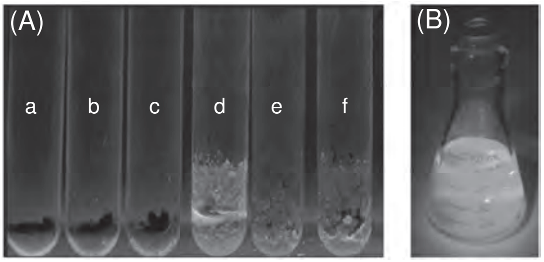


圖 3.　芸香種子萃取物螢光檢測。(A) 冷凍乾燥萃取物顯示出不同芸香種子萃取物其紫外線吸收所產螢光各異。(B) 暴露於短波紫外線 (247 nm) 下，可觀察到從樣本 d 的種子萃取液發出藍紫色螢光。

Fig. 3.　Fluorescence detection of the rue seed extracts. (A) Fluorescence emancipating by different lyophilized extracts. (B) Visualization for blue-purplish fluorescence under UV light exposure with a short wavelength of UV (247 nm) from the extract of sample d.

性，因此大部分的研究團隊捨棄種子而採用芽 (Atta-Alla *et al*. 2008) 或節間組織 (Hussain & Nathar 2020) 誘發體外培養的方式來進行芸香保株。惟因芸香所含之肉桂芸香鹼大多存在於其種子中 (Rayburn 2007)，且獲取肉桂芸香鹼以期在疾病預防治療時扮演關鍵角色，故以異於植物保護復育之方式，從種子中培育出植株後，篩選生物鹼高產之品種。

代謝自氨茴酸 (anthranilic acid) 的肉桂芸香鹼，不僅可在芸香科 (Rutaceae) 之芸香中發現，如主要分布在熱帶、亞熱帶、溫帶的乾旱地區的約 250 種蒺藜科 (Zygophyllaceae) 亦被報導含肉桂芸香鹼 (Aniszewski 2007)。其他還有南美安地斯山脈的酢醬薯 (*Oxalis tuberose* L.) (Bais *et al*. 2002)、百香果 (*Passiflora*

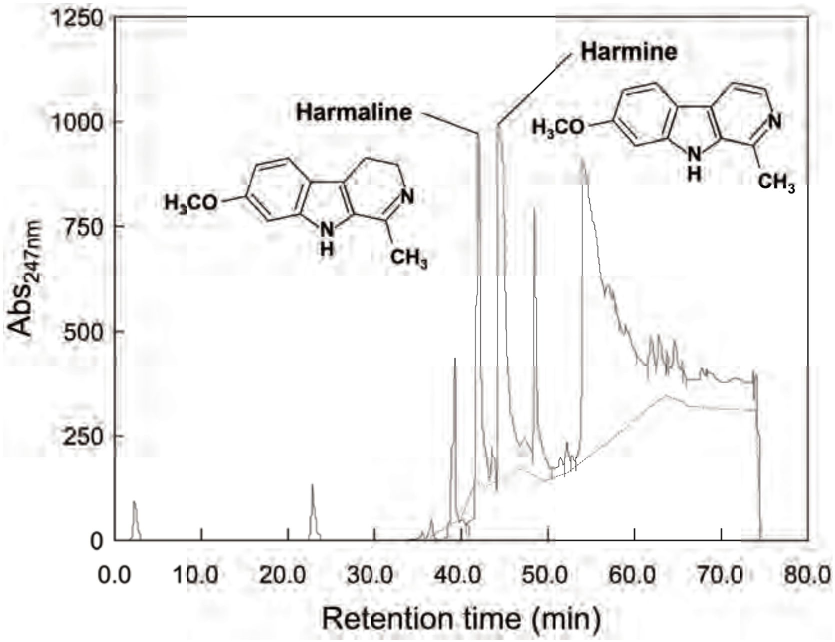


圖 4. 芸香種子萃取物多步梯度高效液相層析檢測；色譜圖鑑定出含有肉桂芸香鹼和氫化肉桂芸香鹼。

Fig. 4. Separation and characterization of the rue seed extract. The chromatographic profile shows the presence of harmaline and harmine.

edulis) (Pereira *et al*. 2014)，甚至於同屬無患子目的近親敘利亞芸香 (*Peganum harmala* L.) (Berlin *et al*. 1993) 的種子中，亦含有大量包括肉桂芸香鹼的吲哚類生物鹼。但進口外來植物牽涉到複雜的檢疫程序，且台灣的體質即是多樣性，過去也原生存在許多被外人稱道的芸香，珍貴遺產值得後人繼承發揮。本研究利用種子篩選出的植株，其肉桂芸香鹼產量每 100 g 種子在 0.75 g 左右，若能進一步改良萃取條件，之後即可將高產樣本進行大量繁殖以穩定取得肉桂芸香鹼，並應用於保健產業中。商業培養純化後，民眾可直接購買衍生商品，不須採集野外族群，不但可避免過敏等副作用，同時也減輕野外芸香族群之壓力。

引用文獻

Aniszewski, T. 2007. Definition, typology and occurrence of alkaloids. p.1–60. *in*: Alkaloids- Secrets of Life: Aklaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. (Aniszewski, T., ed.) Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. 334 pp.

Atta-Alla, H. K., I. H. A. El Soud, and M. H. Eid. 2008. *In vitro* culture of *Ruta graveolens* L. Catrina. Intl. J. Environ. Sci. 3:33–36.

Bais, H. P., S. W. Park, F. R. Stermitz, K. M. Halligan, and J. M. Vivanco. 2002. Exudation of fluorescent β-carbolines from *Oxalis tuberosa* L. roots. Phytochemistry 61:539–543. doi:10.1016/s0031-9422(02)00235-2

Benzekri, R., L. Bouslama, A. Papetti, M. Hammami, A. Smaoui, and F. Limam. 2018. Anti HSV-2 activity of *Peganum harmala* (L.) and isolation of the active compound. Microb. Pathog. 114:291–298. doi:10.1016/j.micpath.2017.12.017

Berlin, J., C. Rügenhagen, N. Greidziak, I. N. Kuzovkina, L. Witte, and V. Wray. 1993. Biosynthesis of serotonin and β-carboline alkaloids in hairy root cultures of *Peganum harmala*. Phytochemistry 33:593–597. doi:10.1016/0031-9422(93)85453-X

Carvalho, A., J. Chu, C. Meinguet, R. Kiss, G. Vandenbussche, B. Masereel, J. Wouters, A. Kornienko, J. Pelletier, and V. Mathieu. 2017. A harmine-derived β-carboline displays anti-cancer effects *in vitro* by targeting protein synthesis. Eur. J. Pharmacol.

805:25–35. doi:10.1016/j.ejphar.2017.03.034

Chen, D., X. Tian, X. Zou, S. Xu, H. Wang, N. Zheng, and Z. Wu. 2018. Harmine, a small molecule derived from natural sources, inhibits enterovirus 71 replication by targeting NF-κB pathway. Int. Immunopharmacol. 60:111–120. doi:10.1016/j.intimp.2018.04.050

Daunay, M. C., J. Janick, and H. S. Paris. 2009. *Tacuinum sanitatis*: Horticulture and health in the late middle ages. Chron. Horticult. 49:22–29.

Elgubbi, H., G. S. G. Haith, and M. Balto. 2017. Harmine isolation and purification by a new design of silica gel column chromatography. EC Nutr. 10:51–56.

Göckler, N., G. Jofre, C. Papadopoulos, U. Soppa, F. J. Tejedor, and W. Becker. 2009. Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. FEBS J. 276:6324–6337. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07346.x

Goel, N., N. Singh, and R. Saini. 2009. Efficient *in vitro* multiplication of Syrian Rue (*Peganum harmala* L.) using 6-benzylaminopurine pre-conditioned seedling explants. Nat. Sci. 7:129–134.

Hudson, J. B., E. A. Graham, and G. H. N. Towers. 1986. Antiviral effect of harmine, a photoactive β-carboline alkaloid. Photochem. Photobiol. 43:21–26. doi:10.1111/j.1751-1097.1986.tb05586.x

Hussain, M. A. and V. N. Nathar. 2020. *In vitro* method of high-frequency plant regeneration through internodal callus of *Ruta graveolens* L. p.761–768. *in*: Medicinal Plants: Biodiversity, Sustainable Utilization and Conservation. (Khasim, S. M., C. Long, K. Thammasiri, and H. Lutken, eds.) Springer. Singapore, Singapore. 829 pp. doi:10.1007/978-981-15-1636-8

Hutterer, C., J. Milbradt, S. Hamilton, M. Zaja, J. Leban, C. Henry, D. Vitt, M. Steingruber , E. Sonntag , I. Zeitträger, H. Bahsi, T. Stamminger, W. Rawlinson, S. Strobl, and M. Marschall. 2017. Inhibitors of dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases (DYRK) exert a strong anti-herpesviral activity. Antivir. Res. 143:113–121. doi:10.1016/j.antiviral.2017.04.003

Li, C., Y. Wang, C. Wang, X. Yi, M. Li, and X. He. 2017. Anticancer activities of harmine by inducing a pro-death autophagy and apoptosis in human gastric cancer cells. Phytomedicine 28:10–18. doi:10.1016/j.phymed.2017.02.008

Liu, H., D. Han, Y. Liu, X. Hou, J. Wu, H. Li, J. Yang, C. Shen, G. Yang, C. Fu, X. Li, H. Che, J. Ai, and S. Zhao. 2013. Harmine hydrochloride inhibits Akt phosphorylation and depletes the pool of cancer stem-like cells of glioblastoma. J. Neuro-Oncol. 112:39–48. doi:10.1007/s11060-012-1034-x

Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Patel, K., M. Gadewar, R. Tripathi, S. K. Prasad, and D. K. Patel. 2012. A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of β-carboline alkaloid "Harmine". Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2:660–664. doi:10.1016/S2221-1691(12)60116-6

Pereira, C. A. M., T. R. Rodrigues, and J. H. Yariwake. 2014. Quantification of harman alkaloids in sour passion fruit pulp and seeds by a novel dual SBSE-LC/Flu (stir bar sorptive extraction-liquid chromatography with fluorescence detector) method. J. Braz. Chem. Soc. 25:1472–1483. doi:10.5935/0103-5053.20140130

Quintana, V. M., L. E. Piccini, J. D. P. Zénere, E. B. Damonte, M. A. Ponce, and V. Castilla. 2016. Antiviral activity of natural and synthetic β-carbolines against dengue virus. Antiviral. Res. 134:26–33. doi:10.1016/j.antiviral.2016.08.018

Rayburn, D. 2007. Medicinal herbs and plants. p.30–444. *in*: Let's Get Natural with Herbs. (Rayburn, D., ed.) Ozark Mountain Publishing. Huntsville, AR. 676 pp.

Ruan, S., F. Jia, and J. Li. 2017. Potential antitumor effect of harmine in the treatment of thyroid cancer. Evid.-Based Complementary Altern. Med. 2017:9402615. doi:10.1155/2017/9402615

Shankaraiah, N., C. Jadala, S. Nekkanti, K. R. Senwar, N. Nagesh, S. Shrivastava, V. G. M. Naidu, M. Sathish, and A. Kamal. 2016. Design and synthesis of C3-tethered 1,2,3-triazolo-β-carboline derivatives: Anticancer activity, DNA-binding ability, viscosity and molecular modeling studies. Bioorg. Chem. 64:42–50. doi:10.1016/j.bioorg.2015.11.005

Song, Y., D. Kesuma, J. Wang, Y. Deng, J. Duan, J. H. Wang, and R. Z. Qi. 2004. Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 317:128–132. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.019

Tehrani, S. S. H., S. H. S. Shabani, S. T. Enferadi, and Z. Rabiei. 2014. Growth inhibitory impact of *Peganum harmala* L. on two breast cancer cell lines. Iran. J. Biotechnol. 12:8–14.

Wu, T. C. 1993a. 1624–1662 (Dutch Formosa). p.340–345. *in*: The History of Taiwan Agriculture. Department of Cultural Publishing, Independent Evening News. Taipei, Taiwan. 546 pp. (in Chinese)

Wu, T. C. 1993b. Conversions in major crops. p.412–418. *in*: The History of Taiwan Agriculture. Department of Cultural Publishing, Independent Evening News. Taipei, Taiwan. 546 pp. (in Chinese)

Zhang, L., F. Zhang, W. Zhang, L. Chen, N. Gao, Y. Men, X. Xu, and Y. Jiang. 2015. Harmine suppresses homologous recombination repair and inhibits proliferation of hepatoma cells. Cancer Biol. Ther. 16:1585–1592. doi:10.1080/15384047.2015.1078021

Zhao, L. and M. Wink. 2013. The β-carboline alkaloid harmine inhibits telomerase activity of MCF-7 cells by down-regulating hTERT mRNA expression accompanied by an accelerated senescent phenotype. Peer J. 1:e174. doi:10.7717/peerj.174

Establishment of a Rue Plant Breeding System for Harmine by Using Collected Seeds and Micropropagation

Ke-Wei Liu[1,#], Li-Ting Sun[2,#], and Li-Te Chin[3,4,*]

Abstract

Liu, K. W., L. T. Sun, and L. T. Chin. 2020. Establishment of a rue plant breeding system for harmine by using collected seeds and micropropagation. J. Taiwan Agric. Res. 69(4):326–334.

Rue belongs to a perennial herb of the Sapindale order. Rue has been reported with many pharmacological properties, such as anti-cancer, anti-viral, antibacterial and anti-inflammatory effects, primarily because of large amounts of indole alkaloids and harmine in its seeds. It has been documented that the plant has been cultivated endogenously in Taiwan as a medicinal plant since the Dutch occupancy period; however, due to its long history of discontinuity and the popularity of modern medicine, the local large-scale cultivation and its corresponding downstream industries seem to have lost sight. Therefore, we collected seeds from the field and markets in the city of Chiayi as the starting materials in the present study. The seeds were germinated in a solid medium containing MS (Murashige & Skoog 1962) basic salts, and then the germinated shoot apex and cotyledons were cut out from the seedlings as explants. Subsequently, 6-benzylaminopurine (BAP) was used to induce multiple shoots. The resulting shoots were cut into single pieces and cultured in the media of 1/2 MS basic salts supplemented with 4-(indol-3-yl) butyric acid for root formation. Finally, the whole plant was transplanted out of the bottle for soil-based growth. Seeds were harvested and semi-purified by acid extraction. The content of harmine was confirmed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The results indicate that productive rue plants can be successfully preserved using tissue culture technology, and the presence of harmine alkaloids can also be confirmed from the seeds.

Key words: Rue, Harmine, Tissue culture, High-performance liquid chromatography (HPLC).

Received: March 24, 2020; Accepted: August 19, 2020.
* Corresponding author, e-mail: litechin@mail.ncyu.edu.tw
# Authors share equal contributions to this work.
1 Graduate Student, Department of Microbiology, Immunology and Biopharmaceuticals, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
2 Adjunct Research Fellow, Department of Microbiology, Immunology and Biopharmaceuticals, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
3 Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and Biopharmaceuticals, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
4 Adjunct Associate Professor, Graduate Institute of Medical Sciences, National Defense Medical Center, Taipei City, Taiwan, ROC.

台 灣 農 業 研 究

(原《中華農業研究》期刊)

第六十九卷　目次

第一期

研究報告

董耀仁、許北辰	評估施用水楊酸混合液 (SMC溶液) 於小黃瓜植株對棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 之影響	1
吳昭蓉、黃巧雯、張哲瑋、倪蕙芳	*Colletotrichum siamense* 引起之荔枝葉部針點病病原特性及防治藥劑篩選	11
周巧盈、巫思揚、陳琦玲	無人飛行載具之航拍影像應用於水稻倒伏災損判釋	25
李文立、Chinnapan Thanarut、徐智政、李國基、江芬蘭、陳金枝	夜香花嵌紋病毒百香果分離株分子特性及廣效性分子檢測技術之開發應用	46
黃巧雯、黃晉興、李怡靜、陳純葳、謝廷芳	由*Fusarium oxysporum* 引起之小花蕙蘭假球莖腐敗病	65
林羿廷、蔡錦慧、林玟珠、鄧汀欽	感染沙漠玫瑰的緬梔嵌紋病毒 (*Plumeria mosaic virus*) 之鑑定與檢測	77
林素禎、林姿君、簡宣裕	市售溶磷菌肥料產品品質分析	90
湯楊欽憲、張淑君	花蓮縣光復鄉原鄉農民訓練需求評估研究	101

第二期

研究報告

鄭允、吳東鴻、王志賢、黃毓斌、江明耀、呂秀英、楊崇民	瓜實蠅 [*Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett)]「背中區剛毛」受單一顯性基因 *DCm* 抑制表現之研究	113

林靜宜、倪蕙芳、林慧如	具拮抗能力放線菌菌株之鑑定與防治馬鈴薯瘡痂病效果評估	122
梁鈺平、王泰權	台灣地區咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei*) 分離之*Isaria javanica* CAES1 鑑定與致病性測試	132
林聖豐、李奕萱、劉珈琳、楊曼妙、郝秀花	檬果壯鋏普癭蚋之天敵*Aprostocetus* sp. (膜翅目：釉小蜂科) 寄生策略及日律活動	147
曹進義、陳威臣、吳容儀、吳姿穎、夏奇鋸	利用多倍體化及雜交親本篩選改進藍紫色蝴蝶蘭育種研究	154
林思妤、黃晉興、王毓華	甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 收集系外表型變異度之探討及白粉病抗感性之檢測	169

第三期

研究報告

洪千雅、楊淑惠、林照能	苦瓜萃取物總酚、類黃酮、三萜類、胜肽含量及體外抑制血管收縮素轉化酶能力之研究	185
黃桀揚、魏碧玉、孔祥丞、呂昀陞	沼渣與蔗渣對菇類生產之影響	193
林筑蘋、蔡志濃、謝廷芳、安寶貞	紅龍果花期與幼果濕腐病 (病原*Gilbertella persicaria*) 之藥劑篩選與田間防治	207
黃守宏、鄭清煥、陳柏宏	溫度對青翅蟻形隱翅蟲 (*Paederus fuscipes* Curtis) 發育與繁殖之影響	218
夏奇鋸、陳威臣、曹進義、林子凱、紀銘坤	甘藍小孢子培養影響因子之優化研究	227
倪蕙芳、林靜宜、吳昭蓉	咖啡褐眼病之發生及防治藥劑篩選	241

研究簡報

許北辰、董耀仁、余志儒、林鳳琪、江明耀	應用電動推剪及旋風分離法收獲基徵草蛉 [*Mallada basalis* (Walker)] 卵粒	255

第四期

研究報告

李奇峰、曹美華	台灣產縱紋胖爪葉蚤的再次發現與生物學注解 (鞘翅目：金花蟲科：螢金花蟲亞科：葉蚤族)	265
蔡佳欣、黃淑苓、李佳蓉、林靜宜、呂昀陞	青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* Race 1/Biovar 1/Phylotype II/Sequevar 7) 引起之番茄青枯病	274
吳容儀、林景平、謝廷芳、莊耿彰、戴廷恩、張育森	矽膠乾燥技術於蘭科植物種子超低溫保存上之應用研究	286
陸柏憲、詹庭筑、賴永昌	甘藷誘變品系耐鹽性之研究	298
陳威臣、曹進義、吳姿穎、夏奇鈮	穀胱甘肽對孤挺花組培苗瓶內增殖與瓶外生長之影響	312

研究簡報

劉克威、孫立庭、金立德	芸香種子中肉桂芸香鹼成分分析與微體繁殖系統之建立	326

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Contents of Volume 69

Number 1

Research Articles

Yaw-Jen Dong and Bei-Chen Hsiu	Evaluation of the Effects of Spraying Cucumber Seedlings with Salicylic Acid Mixed Solution (SMC Solution) on Cotton Aphids (*Aphis gossypii* Glover)	1
Chao-Jung Wu, Chiao-Wen Huang, Jer-Way Chang, and Hui-Fang Ni	Physiological Characteristics, Pathogenicity and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum siamense* Causing Lychee Pepper Spot Disease	11
Chiao-Ying Chou, Shi-Yang Wu, and Chi-Ling Chen	Rice Lodging Detection Using the Photography from Unmanned Aerial Vehicle (UAV)	25
Wen-Li Lee, Chinnapan Thanarut, Chih-Cheng Hsu, Guo-Chi Lee, Fen-Lang Chiang, and Chin-Chih Chen	Molecular Characterization of the *Telosma mosaic virus* Passionfruit Isolates and the Development and Application of Its Wide-Spectrum Molecular Detection Techniques	46
Chiao-Wen Huang, Jin-Hsing Huang, Yi-Ching Li, Chun-Wei Chen, and Ting-Fang Hsieh	Pseudobulb Rot of *Cymbidium* Caused by *Fusarium oxysporum*	65
Yi-Ting Lin, Chin-Hui Tsai, Mei-Ju Lin, and Ting-Chin Deng	Identification and Detection of *Plumeria mosaic virus* Infecting Desert Rose (*Adenium obesum*)	77
Su-Chen Lin, Zi-Jun Lin, and Shiuan-Yuh Chien	Quality Analysis of Commercial Phosphate-Solubilizing Bio-Fertilizer Products	90
Cin-Sian Tang Yang and Shu-Chun Chang	Assessment Study on Indigenous Farmers Training Needs at Guangfu Township in Hualien County	101

Number 2

Research Articles

Yun Cheng, Dong-Hong Wu, Zu-Hsien Wang, Yu-Bing Huang, Ming-Yao Chiang, Hsiu-Ying Lu, and Chung-Min Yang	Genetically Masked of Dorsocentral Bristle Expression by a Single Dominant Gene *DCm* in Melon Fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquilett)	113
Ching-Yi Lin, Hui-Fang Ni, and Hui-Ju Lin	Identification and Evaluation of Antagonistic Actinobacteria on Controlling Potato Common Scab	122
Yu-Ping Liang and Tai-Chuan Wang	Identification and Pathogenicity of *Isaria javanica* CAES1 Isolated from the Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*) in Taiwan	132
Sheng-Feng Lin, Yi-Syuan Lee, Chia-Lin Liu, Man-Miao Yang, and Hsiou-Hua Hao	Parasitic Strategy and Circadian Rhythm of *Aprostocetus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), a Natural Enemy of Mango Pest *Procontarinia robusta* (Diptera: Cecidomyiidae)	147
Chin-Yi Tsao, Uei-Chern Chen, Rung-Yi Wu, Tzu-Ying Wu, and Chi-Ni Hsia	Polyploidization and Selection of Parents for Improving Breeding of Blue-Purple *Phalaenopsis*	154
Ssu-Yu Lin, Jin-Hsing Huang, and Yu-Hwa Wang	Morphological Diversity and Resistance to Powdery Mildew in Melon (*Cucumis melo* L.) Accessions	169

Number 3

Research Articles

Chien-Ya Hung, Shu-Hui Yang, and Jaw-Neng Lin	Determination of Contents of Total Phenol, Flavonoid, Triterpenoid and Peptide and *In Vitro* Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Bitter Melon Extract	185
Chi-Yung Huang, Bee-Yu Wei, Hsiang-Cheng Hung, and Yun-Sheng Lu	Effects of Biogas Residue and Bagasse on Mushroom Production	193
Chu-Ping Lin, Jyh-Nong Tsai, Ting-Fang Hsieh, and Pao-Jen Ann	Chemical Screening and Field Trials for Controlling Pitaya Flower Wet Rot Caused by *Gilbertella persicaria*	207
Shou-Horng Huang, Ching-Huan Cheng, and Po-Hung Chen	Effects of Temperature on Development and Reproduction of the Rove Beetle, *Paederus fuscipes* Curtis, Feeding on *Nilaparvata lugens* (Stål)	218
Chi-Ni Hsia, Uei-Chern Chen, Chin-Yi Tsao, Tzu-Kai Lin, and Ming-Kun Chi	Optimization of Affecting Factors on Microspore Culture in Cabbage	227
Hui-Fang Ni, Ching-Yi Lin, and Chao-Jung Wu	Etiology and Fungicide Screening of Coffee Brown Eye Spot Disease	241

Short Communication

Pei-Chen Hsu, Yew-Jen Dong, Jih-Zu Yu, Feng-Chyi Lin, and Ming-Yao Chiang	Harvesting of *Mallada basalis* (Walker) Eggs Using a Hair Clipper and Cyclonic Separation	255

Number 4

Research Articles

Chi-Feng Lee and Mei-Hua Tsou	Rediscovery of *Philopona vibex* (Erichson, 1834) (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini) in Taiwan, with Notes on Its Biology	265
Chia-Hsin Tsai, Shu-Ling Hwang, Jia-Rong Li, Ching-Yi Lin, and Yun-Sheng Lu	Occurrence of *Ralstonia solanacearum* Race 1/Biovar 1/ Phylotype II/Sequevar 7 Causing Tomato Bacterial Wilt in Taiwan	274
Rung-Yi Wu, Ching-Ping Lin, Ting-Fang Hsieh, Keng-Chang Chuang, Ting-En Dai, and Yu-Sen Chang	Study on Cryopreservation of Orchidaceae Seeds by Silica Gel Desiccation and Its Application	286
Po-Hsien Lu, Ting-Zhu Zhan, and Yung-Chang Lai	The Study of Salt Tolerance in Sweet Potato Mutants	298
Uei-Chern Chen, Jhin-Yi Tsao, Tzu-Ying Wu, and Chi-Ni Hsia	Effect of Glutathione on *In Vitro* Proliferation and *Ex Vitro* Growth of *Hippeastrum hybridum* Plantlets	312

Short Communication

Ke-Wei Liu, Li-Ting Sun, and Li-Te Chin	Establishment of a Rue Plant Breeding System for Harmine by Using Collected Seeds and Micropropagation	326

台 灣 農 業 研 究

作者索引

Chinnapan Thanarut 46
孔祥丞 193
王志賢 113
王泰權 132
王毓華 169
安寶貞 207
江明耀 113, 255
江芬蘭 46
余志儒 255
吳東鴻 113
吳姿穎 154, 312
吳昭蓉 11, 241
吳容儀 154, 286
呂秀英 113
呂昀陞 193, 274
巫思揚 25
李文立 46
李佳蓉 274
李奇峰 265
李怡靜 65
李奕萓 147
李國基 46
周巧盈 25
林子凱 227
林玫珠 77
林姿君 90
林思妤 169
林羿廷 77
林素禎 90
林景平 286
林筑蘋 207
林照能 185
林聖豐 147
林鳳琪 255
林慧如 122
林靜宜 122, 241, 274
金立德 326
洪千雅 185
紀銘坤 227
倪蕙芳 11, 122, 241
夏奇鋹 154, 227, 312
孫立庭 326
徐智政 46
郝秀花 147
張育森 286
張哲瑋 11
張淑君 101
曹美華 265
曹進義 154, 227, 312
梁鈺平 132
莊秋彰 286
許北辰 1, 255
陳金枝 46
陳威臣 154, 227, 312
陳柏宏 218
陳純葳 65
陳琦玲 25
陸柏憲 298
湯楊欽憲 101
黃巧雯 11, 65
黃守宏 218
黃晉興 65, 169
黃淑苓 274
黃棨揚 193
黃毓斌 113

楊崇民 113
楊曼妙 147
楊淑惠 185
董耀仁 1, 255
詹庭筑 298
劉克威 326
劉珈琳 147
蔡志濃 207
蔡佳欣 274
蔡錦慧 77
鄧汀欽 77
鄭允 113
鄭清煥 218
賴永昌 298
戴廷恩 286
謝廷芳 65, 207, 286
簡宣裕 90
魏碧玉 193

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Authors Index

Ann, Pao-Jen 207
Chang, Jer-Way 11
Chang, Shu-Chun 101
Chang, Yu-Sen 286
Chen, Chi-Ling 25
Chen, Chin-Chih 46
Chen, Chun-Wei 65
Chen, Po-Hung 218
Chen, Uei-Chern 154, 227, 312
Cheng, Ching-Huan 218
Cheng, Yun 113
Chi, Ming-Kun 227
Chiang, Fen-Lang 46
Chiang, Ming-Yao 113, 255
Chien, Shiuan-Yuh 90
Chin, Li-Te 326
Chinnapan Thanarut 46
Chou, Chiao-Ying 25
Chuang, Keng-Chang 286
Dai, Ting-En 286
Deng, Ting-Chin 77
Dong, Yaw-Jen 1
(see also Dong, Yew-Jen 255)
Dong, Yew-Jen 255
(see also Dong, Yaw-Jen 1)
Hao, Hsiou-Hua 147
Hsia, Chi-Ni 154, 227, 312
Hsieh, Ting-Fang 65, 207, 286
Hsiu, Bei-Chen 1
(see also Hsu, Pei-Chen 255)
Hsu, Chih-Cheng 46
Hsu, Pei-Chen 255
(see also Hsiu, Bei-Chen 1)
Huang, Chi-Yung 193
Huang, Chiao-Wen 11, 65
Huang, Jin-Hsing 65, 169
Huang, Shou-Horng 218
Huang, Yu-Bing 113
Hung, Chien-Ya 185
Hung, Hsiang-Cheng 193
Hwang, Shu-Ling 274
Lai, Yung-Chang 298
Lee, Chi-Feng 265
Lee, Guo-Chi 46
Lee, Wen-Li 46
Lee, Yi-Syuan 147
Li, Jia-Rong 274
Li, Yi-Ching 65
Liang, Yu-Ping 132
Lin, Ching-Ping 286
Lin, Ching-Yi 122, 241, 274
Lin, Chu-Ping 207
Lin, Feng-Chyi 255
Lin, Hui-Ju 122
Lin, Jaw-Neng 185
Lin, Mei-Ju 77
Lin, Sheng-Feng 147
Lin, Ssu-Yu 169
Lin, Su-Chen 90
Lin, Tzu-Kai 227
Lin, Yi-Ting 77
Lin, Zi-Jun 90

Liu, Chia-Lin 147
Liu, Ke-Wei 326
Lu, Hsiu-Ying 113
Lu, Po-Hsien 298
Lu, Yun-Sheng 193, 274
Ni, Hui-Fang 11, 122, 241
Sun, Li-Ting 326
Tang Yang, Cin-Sian 101
Tsai, Chia-Hsin 274
Tsai, Chin-Hui 77
Tsai, Jyh-Nong 207
Tsao, Chin-Yi 154, 227
(see also Tsao, Jhin-Yi 312)
Tsao, Jhin-Yi 312
(see also Tsao, Chin-Yi 154, 227)
Tsou, Mei-Hua 265
Wang, Tai-Chuan 132
Wang, Yu-Hwa 169
Wang, Zu-Hsien 113
Wei, Bee-Yu 193
Wu, Chao-Jung 11, 241
Wu, Dong-Hong 113
Wu, Rung-Yi 154, 286
Wu, Shi-Yang 25
Wu, Tzu-Ying 154, 312
Yang, Chung-Min 113
Yang, Man-Miao 147
Yang, Shu-Hui 185
Yu, Jih-Zu 255
Zhan, Ting-Zhu 298

台 灣 農 業 研 究

關鍵詞索引

Isaria javanica	132
RT-PCR廣效性檢測	46
大量飼養	255
小孢子胚分化	227
小花蕙蘭	65
內囊骨	273
分離株	77
分類學	273
水楊酸	1
水楊酸甲酯	1
水蓑衣	273
台灣	77, 132, 147
外表型變異度	169
瓜實蠅	121
甘藍	227
甘藷	298
生物天敵	147
生物防治	122, 132
生物活性成分	192
田間試驗	207
白粉病	169
矢車菊素	154
光照處理	312
全長度核酸序列	46
多元抗體	46
收穫	255
百香果	46
肉桂芸香鹼	326
血管收縮素轉化酶	192
卵柄	255
杏鮑菇	193
災損救助	25
咖啡	241
咖啡果小蠹	132
咖啡褐眼病	241
夜香花嵌紋病毒	46
沼渣	193
芸香	326
返祖	121
金花蟲	273
長期保存	286
青枯病菌	274
青翅蟻形隱翅蟲	218
品質管控	90
流式細胞儀	154
秋水仙素	154
紅龍果花期濕腐病	207
耐鹽性	298
背中區剛毛	121
苦瓜	192
倍體數	154
原住民	101
氧化態穀胱甘肽	312
荔枝	11
訓練需求評估	101
針點病	11
馬鈴薯瘡痂病	122
高血壓	192
高效液相層析	326
乾燥法	286
假球莖腐敗病	65
基徵草蛉	255
常態化差異植生指標	25
推剪	255

甜瓜	169
第1生化型	274
第1生理小種	274
第2演化型	274
第7序列變種	274
組織培養	326
循環農業	193
棉蚜	1
氯化膽鹼	1
發育	218
華胄蘭	312
菸草嵌紋病毒屬	77
微生物肥料	90
溫度	218
溶磷菌	90
農民	101
農業災害	25
馴化	312
監測	147
種原	169
誘導防禦	1
誘變品系	298
影像監督分類	25
數值地表模型	25
蔗渣	193
遺傳資源	286
繁殖	218
還原態穀胱甘肽	312
黏蟲紙	147
檬果	147
藍紫色蝴蝶蘭	154
雙單倍體	227
雞蛋花嵌紋病毒	77
藥劑防治	207
藥劑篩選	11, 241
鏈黴菌	122
蘭花	286
鐮孢病菌	65

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Key Words Index

Acclimation 325
Agricultural damage 45
Amaryllis 325
Angiotensin-converting enzyme 185
Antihypertension 185
Atavistic origin 113
Bagasse 206
Bioactive component 185
Bio-fertilizer 100
Biogas residue 206
Biologic control 131
Biological control 146
Biovar 1 285
Bitter melon 185
Blue-purple *Phalaenopsis* 168
Brassica oleracea. var. *capitata* 240
Broad-spectrum detection by RT-PCR 64
Chemical control 217
Choline chloride 10
Circular agriculture 206
Clipper 263
Coffee 254
Coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) 146
Coffee brown eye spot disease 254
Colchicine 168
Cotton aphid 10
Cyanidin 168
Cymbidium 76
Desiccation method 297
Development 226
Digital surface model (DSM) 45
Disaster aid 45
Dorsocentral bristles 113
Doubled haploid 240
Egg stalk 263
Endophallic sclerites 265
Farmers 112
Field trial 217
Flow cytometry 168
Frangipani mosaic virus 89
Full-length sequence 64
Fungicide screening 254
Fungicide sensitivity 24
Fusarium oxysporum 76
Genetic resource 297
Germplasm 183
Harmine 334
Harvesting 263
High-performance liquid chromatography (HPLC) 334
Hygrophila 265
Illumination 325
Image supervised classification 45
Indigenous 112
Induced defense 10
Isaria javanica 146
Isolate 89
Leaf beetles 265
Lychee 24
Mallada basalis (Walker) 263
Mangifera indica L. 153
Mass rearing 263

Melon	183
Melon fly	113
Methyl salicylate	10
Microspore embryogenesis	240
Monitoring	153
Morphological diversity	183
Mutant line	311
Natural enemy	153
Normalized difference vegetation index (NDVI)	45
Orchid	297
Oxidized glutathione	325
Paederus fuscipes Curtis	226
Passiflora sp.	64
Pepper spot disease	24
Phosphate-solubilizing bacteria	100
Phylotype II	285
Pitaya flower wet rot	217
Pleurotus eryngii	206
Polyclonal antibody	64
Polyploidy	168
Potato common scab	131
Powdery mildew	183
Preservation for long-term	297
Pseudobulb	76
Quality supervision	100
Race 1	285
Ralstonia solanacearum	285
Reduced glutathione	325
Reproduction	226
Root rot	76
Rue	334
Salicylic acid	10
Salt tolerance	311
Sequevar 7	285
Sticky traps	153
Streptomyces spp.	131
Sweet potato	311
Taiwan	89, 146, 153
Taxonomy	265
Telosma mosaic virus (TeMV)	64
Temperature	226
Tissue culture	334
Tobamovirus	89
Training needs assessment	112

台灣農業研究　評閱者名單

第 69 卷 (2020)

乃育昕
國立中興大學昆蟲學系

尤進欽
國立宜蘭大學園藝學系

王升陽
國立中興大學森林學系

王智立
國立中興大學植物病理學系

申雍
國立中興大學土壤環境科學系

石憲宗
農業試驗所應用動物組

安寶貞
農業試驗所植物病理組

吳文哲
國立台灣大學昆蟲學系暨研究所

吳立心
國立屏東科技大學植物醫學系

宋祖瑩
大葉大學食品暨應用生物科技學系

李奇峰
農業試驗所應用動物組

杜平悳
嘉南藥理大學食品科技系

杜宜殷
國立台灣大學園藝暨景觀學系

沈佛亭
國立中興大學土壤環境科學系

林宗俊
農業試驗所植物病理組

林宜賢
國立屏東科技大學植物醫學系

洪爭坊
國立中興大學植物病理學系

唐立正
國立中興大學昆蟲學系

張正
國立中興大學園藝學系

莊益源
國立中興大學昆蟲學系

許如君
國立台灣大學昆蟲學系暨研究所

許奕婷
國立中興大學農藝學系

郭美華
國立中興大學昆蟲學系

郭章信
國立嘉義大學植物醫學系

陳甘澍
農業試驗所嘉義分所

陳宗禮
國立中興大學農藝學系

陳美芬
國立台東大學通識教育中心

陳淑恩
國立屏東科技大學農企業管理系

陳煜焜
國立中興大學植物病理學系

陳麗如
中國文化大學園藝暨生物技術學系

黃文理
國立嘉義大學農藝學系

黃政華
國立中興大學土壤環境科學系

黃健瑞
國立嘉義大學植物醫學系

楊正澤
國立中興大學昆蟲學系

葉文斌
國立中興大學昆蟲學系

潘怡君
國立中興大學園藝學系

蔡元卿
國立嘉義大學農藝學系暨研究所

蔡文錫
國立嘉義大學植物醫學系

蔡必焜
國立中興大學生物管理研究所

蔡志濃
農業試驗所植物病理組

蔡媢婷
農業試驗所花卉中心

蔡慧萍
國立中興大學土木工程學系

鄭明倫
國立自然科學博物館生物學組

鄭櫻慧
農業試驗所植物病理組

謝廷芳
農業試驗所植物病理組

謝佳宏
中國文化大學森林暨自然保育學系

羅筱鳳
國立台灣大學園藝暨景觀學系

蘇俊峯
農業試驗所植物病理組

Reviewers, Journal of Taiwan Agricultural Research
Volume 69, 2020

Ann, Po-Jan
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chang, Chen
Department of Horticulture, National Chung HsingUniversity

Chen, Kan Shu
Chia-Yi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Li-Ru
Department of Horticulture and Biotechnology, Chinese Culture University

Chen, Mei-Fen
Center for General Education, National Taitung University

Chen, Shwu-En
Department of Agribusiness Management, National Pingtung University of Science and Technology

Chen, Yuh-Kun
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Chen, Zong-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Cheng, Ying-Huey
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chuang, Yi-Yuan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Duh, Pin-Der
Department of Food Science & Technology, Chia Nan University of Pharmacy and Science

Hong, Cheng-Fang
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Hsieh, Chia-Hung
Department of Forestry and Nature Conservation, Chinese Culture University

Hsieh, Ting-Fang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Hsu, Ju-Chun
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University

Hsu, Yi-Ting
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Huang, Cheng-Hua
Department of Soil and Environmental Science, National Chung Hsing University

Huang, Chien-Jui
Department of Plant Medicine, National Chiayi University

Huang, Wen-Li
Department of Agronomy, National Chiayi University

Jeng, Ming-Luen
Department of Biology, National Museum of Natural Science

Kuo, Chang-Hsin
Department of Plant Medicine, National Chiayi University

Kuo, Mei-Hwa
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Lee, Chi-Feng
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Lin ,Yi-Hsien
Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology

Lin, Tsung-Chun
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Lo, Hsiao-Feng
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Nai, Yu-Shin
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Pan, I-Chun
Department of Horticulture, National Chung HsingUniversity

Shen, Fo-Ting
Department of Soil and Environmental Science, National Chung Hsing University

Shen, Yuan
Department of Soil and Environmental Science, National Chung Hsing University

Shih, Hsien-Tzung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Song, Tuzz-Ying
Department of Food Science and Biotechnology, Da-Yeh University

Su, Jiunn-Feng
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Tang, Li-Cheng
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Tsai, Bi-Kun
Graduate Institute of Bio-Industry Management, National Chung Hsing University

Tsai, Hui-Ping
Department of Civil Engineering, National Chung Hsing University

Tsai, Jyh-Nong
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Tsai, Wei-Ting
Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute

Tsai, Wen-Shi
Department of Plant Medicine, National Chiayi University

Tsai, Yuan-Ching
Department of Agronomy, National Chiayi University

Wang, Chih-Li
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Wang, Sheng-Yang
Department of Forestry, National Chung Hsing University

Wu, Li-Hsin
Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology

Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University

Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Yeh, Wen-Bin
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Yiu, Jinn-Chin
Department of Horticufture, National Ilan University

「台灣農業研究」稿約

一、 本刊為行政院農業委員會農業試驗所發行之學術性期刊 (季刊)，刊登國內、外農業試驗研究相關之研究稿件：

專題論述：由本所期刊編審會或總編輯邀請專家撰寫。

研究報告：關於農業科學未曾發表之研究報告，按題目、作者、摘要、前言、材料與方法、結果、討論、結論 (一般略去，或併入討論)、誌謝 (可略去)、引用文獻等依序撰寫，表與圖附於其後，全文以不超過10印刷頁為原則。其中，'結果' 與 '討論' 如有必要，可合併成'結果與討論'。

研究簡報：關於農業科學未曾發表之簡短原始研究報告，不須分章節撰寫 (亦可參照研究報告次序)，但須附中英文摘要，全文以不超過4印刷頁為原則。

二、 稿件應以中文或英文撰寫，以文書軟體MS WORD®格式儲存成檔案 (檔案類型以Word 97–2003或以上版本文件為佳)。文稿以A4大小 (長29.6公分，寬21公分) 兩倍行高 (double space) 繕打，加行號，12號字體，左邊對齊，版面應預留上下3公分，左右2公分之空間，並自第二頁起在右下角以阿拉伯數字註明頁數。撰寫時，中文以細明體、英文以Times New Roman字體打字；英文字距及句距皆一字節。

三、 投稿者在本刊線上投審系統首頁 (http://www.ipress.tw/J0042) 點選'投稿'，確認及點選稿件已依照稿約撰寫無誤後，下一步即填寫稿件資料，務請填寫封面信函，再依序填寫作者資料、上傳檔案及確認提交。

四、 稿件格式：

題　　目：宜簡短，能充分反應文旨，並附簡題 (Running title) (中文12字；英文6字以內為原則)。英文題目除介系詞、連接詞等字外，每字第一字母應大寫。報告如有機關所屬編號，請列於誌謝。

作　　者：作者姓名置中，作者二人或二人以上時，以中文一全形空格間隔之；英文姓名則名在前姓氏在後，作者二人或二人以上時，以 " , " 相隔，最後一人前加 "and" 字樣，其表示方法如Chen-Seng Huang, Chen-Chang Chen, and Chyr-Guan Chen。每一作者須附小註，以說明所屬機關單位與職稱，通訊作者附予星號" * "，並須附電子郵件信箱。題目與作者同置第一頁。

摘　　要：不分段落、宜簡潔明確。摘要之前應加作者、年代、題目、期刊、及卷期，摘要之後應附關鍵詞 (Key words)，關鍵詞不超過五個，每個英文關鍵詞第一字母應大寫。摘要以不超過五百字為原則。以中 (英) 文發表者須附英 (中) 文摘要，置於本文之後，且內容須與中 (英) 文摘要相符，並附通訊作者、作者之小註。

本　　文：依序為前言 (INTRODUCTION)、材料與方法 (MATERIALS AND METHODS)、結果 (RESULTS)、討論 (DISCUSSION)、結論 (CONCLUSIONS)、誌謝 (ACKNOWLEDGMENTS)、引用文獻 (REFERENCES)。除學名、專有名詞、化學式、數學公式、數字、度量衡單位及縮寫外，文句中不得中外文並用，需使用英 (外) 文以助明瞭時，須將英 (外) 文括號置於中文之後。材料與方法、結果兩部分如有必要須分段 (節)，每一段內並可再分小段，以助明瞭文稿內容。各段題目 (heading) 單行置於該段之前，小段題目 (subheading) 直接置於小段之首。如因結果繁複不易聯接討論，可合併成'結果與討論 (RESULTS AND DISCUSSION)'。如有附錄，請置於引用文獻之前。

表　　格：

1. 每一表格應分別繕製，須以MS WORD®中 “表格” 工具製作，上方須有標題，以句點結尾，並按文中出現順序加上表**1. (Table 1.)**，表**2. (Table 2.)** 等冠號。
2. 中文稿之表格標題應中英文並列，冠號與表幅齊頭，表內項目及內容以英文書寫。英文標題及各欄英文細目，除第一字之第一字母大寫外，餘均小寫。單位使用SI units (如 $g L^{-1}$、$Mg ha^{-1}$、$m s^{-1}$)，一律單數、英文字母。
3. 表格應加分析、簡化與歸納後始可列表。每一表格應在文中標示清楚，以便對照，且每一表格應單頁製作。
4. 表中內容如需說明，均須附加小註，以z, y, x, ...等縮小小寫字母置於右上角，並於表下依次敘述。表格僅列橫線。星號 “* (5%顯著性水準)”、“** (1%顯著性水準)” 保留統計顯著性使用。
5. 性質類同之圖與表，務請精簡與合併。

圖　　片：

1. 手繪圖版以黑色墨水於白色紙上分別繪製，掃描後存成JPG電子檔 (或JPEG電子檔) 上傳。如以電腦繪圖，力求清晰，亦存成JPG檔 (或JPEG檔) 上傳，或直接貼於本文之後。請勿使用MS Office內建軟體繪圖，建議使用專業繪圖軟體 (如Sigma Plot) 繪製。
2. 圖中所有標示應以英文書寫 (Arial字型) 或註明於標題之後小標一律以(A), (B), (C), ...編號，編號以置入圖框為原則，分類學則可以1, 2, 3, ...標示。
3. 照片以光面紙為原則，清晰度以縮小50%可判讀為宜。多幅照片儘量製成併版；如有特別指明，應加圈或箭頭表明。顯微照相，應加比例尺大小；照片大小以不超過版面 (25 cm × 18 cm) 為宜，掃描後存成JPG檔 (或JPEG檔) 上傳，解析度300 dpi或以上，並直接貼於本文之後。
4. 圖版及照片應有標題，並按文中出現的順序加上 **(圖1) (Fig. 1)**、**(圖2) (Fig. 2)** 等冠號，在文中須標示清楚，以便對照。中文稿標題應中英文併列，英文稿標題以英文書寫即可，力求明確。
5. 除併圖外，每一圖片應單頁製作。
6. 圖版及照片未達印製之解析度要求，文稿將不予刊登。

誌　　謝：不分段落，包括人物、經費來源、報告之機關賦予編號等。誌謝可略去。

引用文獻：

1. 列舉確實曾引用之文獻。文獻以登載於學術性期刊、書籍、研討會之文章及學位論文為限 (不含推廣報告)，如引用網路學術性報告，須加註瀏覽、下載日期及網址路徑。
2. 文中涉及引用文獻時，根據該文獻的作者與年代加以括號：如 (Sung 1991)、(Lo 1991, 1992)、(Chen & Ho 1983)、(Sung 1991; Hsu *et al*. 1992)，以年代先後為序置於引用文處。
3. 文獻一律以英文撰寫，以姓名字母為序。作者相同時以年代先後為序。
4. 文獻之書寫方法以期刊為例，依序為作者、年代、題目、期刊、卷數、頁數。在每卷每期之頁碼都從數字 1開始的期刊，才必須加上期數。
5. 期刊名須依該期刊公告之縮寫撰寫；如無者，請參照Biosciences Information Service (1992) 出版之 “Serial Sources for the BIOSIS Previews Database” 或依該學術領域之慣例撰寫。

6. 文獻書寫範例如下：

(1) 原中文報告引用文獻出自學術性期刊

Hsu, S. H., T. Y. Chung, T. C. Kuo, and S. F. Wang. 1992. Studies on the micro-climate of greenhouse. I. Light environment of greenhouse. J. Agric. China 157:34–43. (in Chinese with English abstract)

(2) 原中文報告引用文獻出自著作性書籍

Sung, J. M. 1991. Nitrogen Metabolism of Rice. Chinese Agronomy Press. Taipei. 100 pp. (in Chinese)

(3) 原中文報告引用文獻出自編輯性書籍

Yang, C. M. and C. Y. Lin. 2003. Studies on rice precision farming system. p.1–12. *in*: Rice Precision Farming System. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 105. Taichung, Taiwan. 252 pp. (in Chinese with English abstract)

(4) 原中文報告引用文獻出自研討會專刊

Chang, C. A. 2001. Application and extension of virus-free seedling for the control of virus diseases of passion fruit in Taiwan. p.31–38. *in*: Proceeding of Symposium on Application of Healthy Plant for Control of Plant Diseases. November 24, 2001. Taichung, Taiwan.Taiwan Phytopathol. Soc. Publ., Taichung. (in Chinese with English abstract)

(5) 原報告引用文獻出自特定網頁資料

Lehtomäki, A. 2006. Biogas production from energy crops and crop residues. Jyväskylä Stud. Biol. Environ. Sci. 163. Univ. of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland. https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/13152/9513925595.pdf (visit on 12/16/2014)

五、 單位、縮寫格式、括號及統計分析

1.凡文中出現之數值，除非另有特別之意義，一律用阿拉伯數字書寫。數字在句首之英文稿，改以文字表示。單位則用國際公認標準符號 (SI units) 代替全文，各常用之縮寫單位參照說明如下：

(1) 長度：公里 (km)、公尺 (= 米) (m)、公分 (= 厘米) (cm)、公釐 (= 毫米) (mm)、微米 (μm)。

(2) 重量 (W)：公噸 (Mg)、公斤 (kg)、公克 (g)、毫克 (mg)、微克 (μg)。

(3) 容積 (V)：公升 (L)、公撮 (= 毫升) (mL)、微升 (μL)。

(4) 面積：公頃 (ha)、平方公尺 (m^2)、平方公分 (cm^2)。

(5) 溫度：攝氏 (℃)、絕對溫度 (K，但須加以說明)。

(6) 時間：日 (天) (d)、時 (h)、分 (min)、秒 (s)。

(7) 濃度：莫耳 (M)、千分之一莫耳 (mM)、當量 (N)、千分之一當量 (mN)。

(8) 重力加速度：*g*。

(9) 分子量：kDa。

(10) 肥料三要素：如以肥料種類N-P_2O_5-K_2O，如以元素N-P-K。

2.其他之縮寫：平均 (*avg*.)、大約 (*ca*.)、直徑 (diam.)。

3.括號：括號字型全以半形 ( )，括號前後各空一格。

4.統計分析：達顯著性水準以*、**或處理間顯著差異區分，以a、b、c、…表示者均應加註顯著機率值P (例如$P < 0.01$)；各統計量請採慣用符號，例如相關係數 (r) 、決定係數 (R^2)、變異係數 (cv)、標準差 (sd)、平均值標準差 (se) 等。

5.其他問題：

(1) 單位與其前面數值之間應空一格，如220 g。

(2) 數學運算符號與其前後數值之間應各空一格，如$P = 0.014$、23.6 ± 3.0、15×2。

(3) 在 ±、× 或to的前後兩數值若是含有單位，請用23.6% ± 3.0%、15 cm × 2 cm、20℃ to 30℃ (即勿省略前面數值之單位)。

(4) 數值起迄符號用– (半型破折號；EN Dash)，勿用 ~ 或 -，且與前後兩數值之間無須留空格，如3–6、2005–2007年、7月20–25日。

(5) 年代一律用西元。

(6) 濃度與容量單位使用mg L^{-1} (勿用ppm)。

(7) 轉速單位使用× *g* (勿用rpm)。

六、 其他注意事項

1. 本刊採網路線上投審，來稿請至本刊線上投審系統網址 (http://www.ipress.tw/J0042) 進行投稿作業，投稿前務請詳閱稿約及投稿須知，並可參閱最新一期報告。
2. 生物學名以斜體字表示，屬名第一字母大寫。學名於摘要、本文、每一圖表中第一次出現時，須寫全名，如*Citrus sinensis*；第二次出現時，屬名保留第一字母後加句點 “.”，種名全寫，如*C. sinensis*。生物學名於本文中首次出現時應加註命名者，如*Oryza sativa* L.。
3. 中文稿件中，外文名詞應儘量翻譯成中文，若是不常見名詞應於文中第一次出現時以括號標出原文。摘要及本文中，英文縮寫於第一次出現時，須附全名。圖版及照片如有英文縮寫，應於標題中附全名，表格內之英文縮寫，須於小註附全名。
4. 農作物品種名須加上單引號，中文用「」(如水稻「台稉9號」、木瓜「台農2號」)，英文用‘’ (如rice ‘TK9’, papaya ‘TNG2’)。

七、 投稿方式

1. 稿件內容務須依照上列規定格式書寫及線上投稿，本期刊編審會保有修改與退稿之權利。文稿經本期刊接受後，由作者負責前二校。除筆誤與錯字外，作者在校稿時，不得擅自更改內容與數據。
2. 投稿前請詳閱稿約及參見最一期刊登報告，投審稿件程序請上網參閱本期刊網址：http://www.ipress.tw/J0042。

八、 投稿本期刊之稿件，不得投稿其他刊物。稿件經本期刊接受後，刊登權屬發行單位農業試驗所所有，非經本所書面同意，不得轉載或移轉他處發表。本期刊具專屬版權，恕不受理一稿兩投之文章 (已刊載或投寄國內外有版權刊物之文章，請勿再投稿本刊)。若有上述情事除依相關法律處理責由作者自負外，本刊將列入紀錄永不受理其投稿。

九、 本刊以黑白印製為原則，彩圖經編審會同意得以彩色編印。本期刊彩圖編印收費標準調整如下表，由作者自行向廠商支付，未付清前稿件將不予刊登。

彩圖編印收費標準：

總張數	總價 (元)	計價公式
1	5,000	5,000 × 1
2	7,000	5,000 × 1 + 2,000 × 1
3	9,000	5,000 × 1 + 2,000 × 2
4	11,000	5,000 × 1 + 2,000 × 3
5	13,000	5,000 × 1 + 2,000 × 4
6 張以上	14,500 起	5,000 × 1 + 2,000 × 4 + 1,500 × (n – 5)

十、 其他未盡事宜本期刊得隨時修正或補充。

Instructions to Authors

Journal of Taiwan Agricultural Research (revised on 2 December 2019)

General Information

The *Journal of Taiwan Agricultural Research* (JTAR) is published four issues annually by the Taiwan Agricultural Research Institute (TARI). Researchers and scientists willing to make the contribution in the fields of agricultural development by publishing their full papers of original research, reviews, or short communications in the Journal are highly welcome and appreciated. Research staff affiliated with TARI is not a requirement for publishing in JTAR. All manuscripts should be submitted online at the Journal's website, http://www.ipress.tw/J0042. Follow its instructions. Submissions to JTAR must not simultaneously submit to any other scientific or technical journal.

Scope

After critical review and approval by the editorial board, JTAR publishes articles in plant science; biotechnology; agricultural chemistry; plant protection; agricultural engineering; agricultural economics and extension; industrial strategic management; biostatistics; and bioinformatics. Articles reporting experimentation or research findings in these fields will be peer-reviewed as research articles. Short articles (no more than 4 printed pages) concerned with experimental techniques, results, or unique phenomena will be peer-reviewed as short communications. Review articles will be under invitation by the editorial board of JTAR.

Style

See the latest issue of JTAR for style and layout. General rules are as follows:

- All abbreviations should be defined at the first mention and in tables and figures, and be used throughout the entire article.
- The Latin names of organisms (e.g., plants, pathogens, insects and pests) must always list when appeared at first appearance (in Abstract or text). Give the complete binomial and authorities.
- At first listing both the common and chemical names of pesticides must be given.
- SI units must be used in the manuscript.
- Use the 24-h time system (e.g., 0200 and 1400) and abbreviate dates such as 3 October 2015 or 10/03/2015.
- Except when used with units, spell out numbers one through nine. Put commas for the decimal separator (e.g., 1,356,078 and 6,078) and place a zero before the decimal point (e.g., 0.6078 and 0.078).

Preparation of Manuscript Files

All submitted manuscript files should write in Chinese or English and save it in Microsoft Word 97–2003 or later versions (.doc files or .docx files). Other word processing software is not accepted. High-resolution figure files may be included in manuscript and submitted separately in forms of .jpg files

or .doc files or .docx files, one figure per file. Do not use word processing features such as automated bulleting and numbering, head and subhead formatting, or internal linking. Text should be typed in A4 size (29.6 cm long, 21 cm wide) in double-spaced and be numbered and aligned to the left side, while tables use single-spaced. Only one font and size (font no. 12) is used. Provide the document with an upper and lower margin of 3 cm and a left and right margin of 2 cm. Starting from the second page, indicate the page number on the lower right corner. When typing the manuscript, use the font of MingLiu (細明體) for Chinese and Times New Roman for English. Leave a single space between each English word and sentence. The author submitting the manuscript should click on "Authors" on the front page of Journal's Online Submission and Review System. Under "Author" page, click "Submit a new manuscript". Confirm submission checklist and then complete the information related to the manuscript including a cover letter.

Follow the sequence and instructions to fill out and upload the information. JTAR adopts a double-blind review for all submitted manuscripts. Reviewers will be able to download the submitted files that authors upload to the system. There are three main types of articles published by JTAR, i.e., "Reviews", "Research Articles", and "Short Communications".

Reviews. A review article is invited by editor-in-chief of JTAR and will be reviewed and revised to assure an appropriate style and content.

Research Articles. Write a research article according to the mentioned scope in the following sequence: title, author(s), abstract, and text. Attach tables, figure captions, and figures at the end of text. In general, each manuscript should not exceed 10 printed pages.

Short Communications. An article that has a size less than 4 printed pages concerned with experimental techniques, results, or unique phenomena may be published as a short communication when accepted.

Title. A title highlights the subject and purpose of the article briefly but clearly. Use common names of crops, avoid abbreviations, and limit words where possible. Except prepositions and connectives, capitalize each word in the English title. Write down the suggested running title, with no more than twelve Chinese characters or six English words, in the next sentence.

Author. List names of all authors below the title and place an asterisk after the corresponding author. The next sentence lists professional titles, institutions and complete addresses of all authors. Provide e-mail address of the corresponding author. Place title and author(s) on the same page.

Abstract. Each article has a single self-contained paragraph, containing the rationale, objectives, methods, results, and their meaning or scope of application specifically. Identify the important details to interpret the results but try not to exceed five hundred words. Do not cite references and avoid equations. In the next sentence, include no more than five key words and capitalize the first letter of each word. If the manuscript written in Chinese (English), place English (Chinese) abstract after the main text of the manuscript.

Text. The text includes the following sections in sequence: INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, CONCLUSIONS (optional), ACKNOWLEDGMENTS (may be omitted), and REFERENCES. If required, combine the results and discussion section into "RESULTS AND DISCUSSION", and incorporate the conclusions into the discussion. If there is an appendix, place

it before the references. Except necessary, do not mix English with other languages. If required, place headings and subheadings at the head of paragraphs of the sections MATERIALS AND METHODS and RESULTS.

Tables. Prepare tables with the tables feature of MS WORD®; do not use tab keys, space bars, or graphics boxes. Number tables consecutively with one table per page. Place tables at the end of text. Each datum needs to be contained in a defined cell. Table heads should be complete and self-contained but brief. All variables should be defined and abbreviations be spelled out in table footnotes. Follow the order of z, y, x, w, v, u, …. The *, **, and *** are used only to show statistical significance at the 0.05, 0.01, and 0.001 probability levels, respectively. Lack of significance indicates as NS. Asterisks or letters next to values indicate statistical significance and should align them in the same cell as the value. All footnotes should be set on separate lines. Capitalize only the first word in a row of the body of a table with the exception of proper nouns. Use only SI units (e.g., $\mu g\ L^{-1}$, $Mg\ ha^{-1}$, and $m\ s^{-1}$) in the singular forms.

Figures. Provide clear contrast figures in high-resolution JPG files (≧ 300 dpi) and upload them on-line as individual files and attach them after tables; one figure one page. Keep relative sizes of symbols, letters, and numbers as the original should be larger than the intended final size. Use English for letters in Arial font. Explain curves or symbols in a legend within the figure. JTAR will publish figures in black and white. Color figures, images, photos or maps are subject to the agreement of the editorial board and fee must be paid before the manuscript is published in the journal. Photographs and drawings for graphs and charts should be prepared with good contrast of dark and light and no more than the size of 25 cm × 18 cm. Use English for figure captions and separate captions for figures. A caption should be concise but given in sufficient detail. Define the crop or soil involved, the major variables presented, the place and year, and the abbreviations and symbols used in the caption. Indicate the scale for illustrations.

Acknowledgments. If required, provide it in a single paragraph. List institutional sponsors, the institutional article number, and contribution acknowledgment.

References. The reference section lists published literature and unpublished reports, theses, and dissertations cited in the manuscripts. Alphabetize the list by the surnames of the first author, followed by the other authors. Cite unpublished data, personal communications, and reports in the text only (in parentheses). Give the authors, year, complete article title, abbreviated journal title, volume number, and inclusive pages for journal articles. Give the authors, year, chapter title, pages, complete book title, book editor, publisher, and place of publication for book chapters. Add also the place and date of the conference for proceedings. For electronic references and others, see the current issues of JTAR. Single author references precede multiple-author references for the same first author. Use chronological order for references with identical authorship. Add a lowercase letter (i.e., a, b, c, etc.) to the year to identify same-year or multiple-author references for text citation. Write the author and year of the cited references inside parentheses; for example, (Chen & Ho 1983; Sung 1991; Hsu *et al.* 1992). Refer to the "Serial Sources for the BIOSIS Previews Database" published by Biosciences Information Service (1992) for the abbreviations of an academic journal. Some reference examples:

- Reference from an academic journal written in Chinese:
  Hsu, S. H., T. Y. Chung, T. C. Kuo, and S. F. Wang. 1992. Studies on the micro-climate of greenhouse. I. Light environment of greenhouse. J. Agric. Res. China 157:34–43. (in Chinese with English abstract)
- Reference from a book written in Chinese:
  Sung, J. M. 1991. Nitrogen Metabolism of Rice. Chinese Agronomy Press. Taipei. 100 pp. (in Chinese)
- Reference from an edited book written in Chinese:
  Yang, C. M. and C. Y. Lin. 2003. Studies on rice precision farming system. p.1–12. *in*: Rice Precision Farming System. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 105. Taichung, Taiwan. 252 pp. (in Chinese with English abstract)
- Reference from a proceedings written in Chinese:
  Chang, C. A. 2001. Application and extension of virus-free seedling for the control of virus diseases of passion fruit in Taiwan. p.31–38. *in*: Proceeding of Symposium on Application of Healthy Plant for Control of Plant Diseases. Taichung, Taiwan. November 24, 2001. Taiwan Phytopathol. Soc. Publ., Taichung. (in Chinese with English abstract)
- Reference from a website:
  Lehtomäki, A. 2006. Biogas production from energy crops and crop residues. Jyväskylä Stud. Biol. Environ. Sci. 163. Univ. of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland. https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/13152/9513925595.pdf (visit on 12/16/2014)

Units, Abbreviations, and Statistical Analysis

Use the SI system (Systéme International de Unités) in JTAR. Some commonly used abbreviated units:

- Length: kilometers (km), meter (m), centimeter (cm), millimeter (mm), micrometer (μm)
- Weight (W): ton (Mg), kilogram (kg), gram (g), milligram (mg), microgram (μg)
- Volume (V): litre (L), millilitre (mL), microlitre (μL)
- Surface: hectare (ha), square meter (m^2)
- Temperature: Celsius (℃), absolute temperature (K, but must be indicated)
- Time: day (d), hour (h), minute (min), second (s)
- Concentration: mole (M), millimole (mM), normal (N), millinormal (mN)
- Gravitational acceleration: *g*
- Molecular weight: kDa
- Three macronutrients in fertilizers: element─N-P-K ; equaivalent quantity─$N-P_2O_5-K_2O$

  Other abbreviations:
- Average: *avg*.
- Approximate: *ca*.
- Diameter: diam.
- Concentration: e.g. mg L^{-1}.
- Frequency of a rotation: × *g*.

Statistical Analysis

Manuscripts should contain enough details of experimental design so that the results can be judged for validity and repeatability. The symbols * and ** are used to show differences in statistical significance. Add *P* value (e.g. $P < 0.01$) when a, b, c, ... are used to classify statistical significance. Examples of commonly used symbols: *r* for correlation coefficient, R^2 for coefficient of determination, cv for coefficient of variation, sd for standard deviation, and se for standard error.

Accepted Manuscripts

When a submitted manuscript is accepted, corresponding author will receive notification from an editor or editor-in-chief, and the accepted files will be used for press. Authors are responsible for obtaining all permissions for use of materials in the manuscripts from other publishers and should notify the editor at the time the manuscript is accepted. JTAR reserves the right to publish and republish any parts submitted with a manuscript.

Plagiarism

Manuscripts may be screened for plagiarism upon submission. If there appears significant duplicate content with other sources, the manuscript will be forwarded to the journal editor for evaluation and action.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chang, Ruey-Jang
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University

Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Chen, Yu-Hui
Department of Agricultural Economics, National Taiwan University

Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University

Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University

Ko, Chiun-Cheng
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University

Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University

Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University

Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Shen, Wei-Chiang
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Wang, Shu-Jen
Department of Agronomy, National Taiwan University

Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University

Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Invited Editors

Chang, Yao-Chien
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Chen, Yen-Ming
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Wang, Zi-Yu
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Consultants to Editorial Office

Chen, Lit-Fu
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 69 No. 4 December 31, 2020

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Hsueh-Shih Lin
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://www.ipress.tw/J0042
Press	Ainosco Press
Address	18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330